FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1966

THÈSE

N° 460

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

Jean-Marie, Henri CARANJOT

né le 3 décembre 1932 à SAINT-QUENTIN (Aisne)

Interne du C. H. U. de REIMS

Présentée et soutenue publiquement le :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'HYDROXYPROLINE URINAIRE ET DE SA VALEUR SEMIOLOGIQUE

Président : M. Pierre DESGREZ, Professeur

COPEDITH, 70, Rue de Flandre, PARIS 19ème

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1966

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

Jean-Marie, Henri CARANJOT

né le 3 décembre 1932 à SAINT-QUENTIN (Aisne)

Interne du C. H. U. de REIMS

Présentée et soutenue publiquement le :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'HYDROXYPROLINE URINAIRE ET DE SA VALEUR SEMIOLOGIQUE

Président : M. Pierre DESGREZ, Professeur

COPEDITH, 70, Rue de Flandre, PARIS 19ème

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK
LEIDEN

1/1/1966

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Aubin (A.), Bénard (H.), Binet (L.), Bulliard (H.), Cathala (J.), Chabrol (E.), Chailley-Bert (P.), Debré (R.), Fey (B.), Galliard (H.), Gaudart d'Allaines (F. de), Gennes (L. de), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Laroche (G.), Lavier (G.), Lelong (M.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Marchal (G.), Mathieu (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Piédelièvre (R.), Quénu (J.), Renard (G.), Richet (C.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Verne (J.).

DOYEN . . . . . Georges BROUET.
1er ASSESSEUR. . . . . Daniel BARGETON
2e ASSESSEUR. . . . . Jean GOSSET

I. — PROFESSEURS

1° CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie et cytologie pathologiques	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Bactériologie et virologie	TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
—	POLONOVSKI (J.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	MALMEJAC (J.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Biophysique médicale	BUGNARD (L.)
—	DOGNON (A.)
—	DJOURNO (A.)
Cancérologie médicale et sociale	DENOIX (P.)
Chimie pathologique	SCHAPIRA (G.)
Embryologie	TUCHMANN (H.)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	COURY (Ch.)
Histologie	GIROUD (A.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
—	KUSS (R.)
—	VERNE (J.-M.)
Pathologie exotique	N...
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	LAROCHE (Cl.)
—	BRICAIRE (H.)
—	PÉQUIGNOT (H.)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	N...
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
—	LEVY (Mlle J.)
Physiologie	BARGETON (D.)
—	PARROT (J.)
Physiologie et pathologie obstétricales	LEPAGE (F.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)

	MM.
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	CAUCHOIX (J.)
Thérapeutique	CONTE (M.)
Thérapeutique appliquée	LAMOTTE (M.)

b) **Professeurs à titre personnel :**

Anatomie anthropologique	OLIVIER (G.)
Anatomie pathologique	NEZELOF (Ch.)
Bactériologie	BARBIER (P.)
Biochimie médicale	DESGREZ (P.) / DREYFUS (J.-Cl.)
Biologie médicale	BOURLIÈRE (F.)
Histologie	COUJARD (R.)
Parasitologie	LARIVIÈRE (M.)
Pathologie expérimentale	LOEPER (J.) / RICHET (G.)
Physiologie	DEJOURS (P.) / ROUCAYROL (J.-Cl.) / SCHERRER (J.)
Physique médicale	KELLERSHOHN (L.) / GOUGEROT (L.) / TUBIANA (M.)
Radiologie médicale	FISCHGOLD (H.)

2° CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) **Professeurs titulaires :**

		MM.
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)		REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)		SOULIÉ (P.)
— — (Boucicaut)		LENÈGRE (J.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon	LORTAT-JACOB (J.-L.)
	—	N...
	Cochin	LEGER (L.)
	Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
	Saint-Antoine	GOSSET (J.)
	Salpêtrière	SICARD (A.)
	Tenon	OLIVIER (Cl.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin)		MERLE d'AUBIGNÉ (R.)
— — — (Foch)		PADOVANI (P.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)		FÈVRE (M.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)		DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laennec)		MATHEY (J.)
Clinique dermatologique (Saint-Louis)		DUPERRAT (F.)
Clinique endocrinologique (Pitié)		DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)		LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)		HUGUIER (J.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)		DEGOS (R.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades)		TURPIN (R.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)		MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)		DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)		HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)		BERNARD (J.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)		CASTAIGNE (P.)
Cliniques médicales	Bicêtre	DEPARIS (M.)
	Broussais	MILLIEZ (P.)
	Cochin	BROUET (G.)
	Hôtel-Dieu	BARIÉTY (M.)
	Lariboisière	SÈZE (S. de)
	Pitié	DREYFUS (G.)
	Saint-Antoine	KOURILSKY (R.)
	Saint-Antoine	BOUDIN (G.)

	MM.
Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat)	DEBRAY (Ch.)
Clinique médicale infantile et pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	JUSTIN-BESANÇON (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)	DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales — Baudelocque	LACOMME (M.)
Cliniques obstétricales — Saint-Antoine	MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	OFFRET (G.)
— — (Cochin)	BREGEAT (P.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie	MOZZICONACCI (P.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	THIEFFRY (S.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec)	BERNARD (E.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Salpêtrière)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique	GAULTIER (M.)
Clinique traumatologique et orthopédique (R.-Poincaré)	JUDET (R.)
Clinique urologique (Cochin)	ABOULKER (P.)
— — (Necker)	COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	LAPLANE (R.)
Séméiologie médicale (A. Chantin)	DOMART (A.)
— — (Lariboisière)	BOUVRAIN (Y.)
— — (Pitié)	RAMBERT (P.)
— — (Rothschild)	WOLFROMM (R.)
Séméiologie et clinique chirurgicales (Broussais)	POILLEUX (F.)

b) **Professeurs à titre personnel :**

Hématologie	ANDRÉ (R.)
	BOUSSER (J.)
Hydrologie et climatologie	GIBERTON (A.)
Maladies infectieuses	BASTIN (R.)
Médecine	AZERAD (E.)
	BOUR (H.)
	CABROL (Ch.)
	GROSSIORD (A.)
	LAMBLING (A.)
	LAUNAY (Cl.)
	PAYET (M.)
	PERRAULT (M.)
	SIGUIER (F
	WORMS (R.)
Neuro-chirurgie	LE BEAU (J.)
Neurologie	LHERMITTE F.
Neuro-psychiatrie	PICHOT (P.)
Oto-Rhino-Laryngologie	MADURO (R.)
Pédiatrie	POLONOVSKI (Cl.)
	ROYER (P.)
Pneumo-Phtisiologie	KREIS (B.)
	MEYER (A.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE

	MM.
Anatomie pathologique	GOUYGOU (Ch.)
Anesthésiologie	VOURC'H (G.)
Bactériologie	CHRISTOL (D.)
Biochimie médicale	CARTIER (P.) GONNARD (P.)
Biologie médicale	HARTMANN (L.)
Hématologie	BILSKI-PASQUIER (G.)
Maladies infectieuses	DUPONT (V.)
Physique médicale	COURSAGET (J.) GREMY (F.)
Physiologie	GIRARD (Fr.)
Stomatologie	CHAPUT (Mme A.)
Thérapeutique	CHASSAGNE (P.)

III. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie	HAUDUROY (P.) Pr. s. ch
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

IV. — PROFESSEUR ASSOCIÉ

Statistique médicale et épidémiologique	SCHWARTZ (D.)

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Conseillers administratifs	Mlle CHAINTREUIL (G.) M. FAYE (R.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque. Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateurs	Mlles DUMAITRE (P.), LAURENT (H.), LE NOIR (G.),
Bibliothécaires	Mmes CONTET (J.), FORGET (F.), Mlles DUROZOY (M.-F.), ROBERGE (D.), Dr SCHILLER (J.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MES PARENTS

A MA FEMME

A MES ENFANTS

A MES AMIS.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544323_0008

A notre Président de Thèse

Monsieur le Professeur Pierre D E S G R E Z

Professeur de Biochimie Médicale à la Faculté de Médecine de Paris
Chevalier de la Légion d' Honneur.

En témoignage de notre profond respect
et de notre vive gratitude pour le grand
honneur qu'il nous fait de bien vouloir
accepter la présidence de notre thèse.

A mon Maître

Monsieur le Professeur Louis V I L D E

Directeur de l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Reims
Professeur titulaire de la Chaire de Pathologie Médicale
Médecin des Hôpitaux de Reims
Officier des Palmes académiques
Chevalier de la Légion d'Honneur

dans le service duquel j'ai pu bénéficier
de son précieux enseignement.

En hommage respectueux.

A mes Maîtres du Laboratoire de Biochimie Médicale du C.H.U. de Reims

A Monsieur le Docteur G. B O F F A

Maître de Conférences
Agrégé de Biochimie Médicale

En témoignage de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur J.P. B O R E L

Maître de Conférences
Agrégé de Biochimie Médicale
Médecin Biologiste des Hôpitaux de Reims

qui nous a inspiré le sujet de cette thèse, et sans qui cet ouvrage ne serait pas ce qu'il est.

Qu'il reçoive l'expression de notre vive reconnaissance et de notre respectueux dévouement.

A mes Maîtres des Laboratoires de Biologie du C.H.U. de Reims

A Monsieur le Docteur J. B O Y

Maître de Conférences
Agrégé d'Hématologie
Médecin Biologiste des Hôpitaux de Reims

pour la bienveillante sollicitude et
l'enseignement qu'il nous prodigue.

En hommage respectueux.

A Monsieur le Docteur G. D R O P S Y

Maître de Conférences
Agrégé de Bactériologie
Médecin Biologiste des Hôpitaux de Reims

pour la sympathie que vous avez bien
voulu nous manifester et pour votre
enseignement de haute qualité.

En hommage de notre reconnaissance.

A mes Maîtres, Médecins - Chirurgiens - Spécialistes des Hôpitaux de Reims

qui au cours de nos années d'Externat et d'Internat, nous ont dispensé leur enseignement.

A mes Maîtres, Professeurs de l'Ecole de Médecine de Reims et de la Faculté de Médecine de Paris

qu'ils trouvent ici toute notre entière et sincère reconnaissance.

Je remercie bien vivement les Services qui en nous confiant leurs prélèvements et leurs dossiers nous ont permis de réaliser cet ouvrage.

A Monsieur le Docteur J. B O C H E T

Assistant en Biologie des Hôpitaux de Reims

qui par ses conseils et son exemple
nous a aidé à franchir nos premiers
pas en biologie médicale.

Avec toute mon amitié.

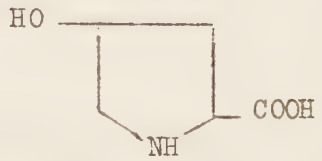
A mes Collègues et Compagnons de travail du Laboratoire de Biochimie Médicale de l'Ecole Nationale de Médecine de Reims.

Je remercie tout particulièrement
Mademoiselle D. ROBIN de son aimable et intelligent concours technique.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'HYDROXYPROLINE URINAIRE ET DE SA VALEUR SEMIOLOGIQUE

I N T R O D U C T I O N

L'hydroxyproline est un acide iminé répondant à la structure suivante :



Il s'agit de la 4-hydroxyproline, ou acide 4-hydroxy-1-pyrrolidone - carboxylique. On a signalé récemment l'existence de l'isomère 3-hydroxy - 1-pyrrolidone - carboxylique dans le collagène (53). Les propriétés des deux isomères sont très proches.

L'hydroxyproline est extrêmement caractéristique du collagène. On ne la trouve pratiquement que dans cette protéine fibrillaire, constituant essentiel du tissu conjonctif, dont elle représente environ 13,4 pour cent en poids.

En dehors du collagène, on l'a signalée à l'état de traces dans l'élastine, autre protéine fibrillaire du tissu conjonctif, dans une lipoprotéine du tissu nerveux, et dans quelques protéines enzymatiques comme la pepsine et l'élastase (77).

La constatation de sa présence dans divers liquides biologiques a suscité beaucoup d'intérêt car elle promettait d'apporter de nombreux renseignements sur le métabolisme du collagène. On peut considérer en effet que l'hydroxyproline des liquides biologiques fait partie de produits de dégradation du collagène. Cette relation est rendue évidente par nos connaissances actuelles sur le métabolisme de l'hydroxyproline.

L'hydroxyproline ne peut être incorporée telle quelle dans le collagène (21). Son précurseur est la proline, acide iminé qui dérive facilement de l'acide glutamique. La proline est incorporée dans le collagène, selon les

réactions habituelles à tous les acides aminés. Son hydroxylation n'intervient qu'après incorporation dans un peptide (54). Certains ont soutenu que cette hydroxylation se faisait sur la proline encore fixée à son ARN-soluble spécifique.

Le mécanisme de l'hydroxylation a été très étudié et n'est pas parfaitement connu (47,59). L'enzyme paraît être du type des hydroxylases utilisant l'oxygène de l'air. L'acide ascorbique est indispensable à la réaction. Il semble bien que ce soit là son principal point d'actionet que sa nécessité dans cette réaction explique les symptômes de sa carence chez l'homme et le cobaye.

L'hydroxyproline est responsable avec la proline de la conformation particulière du collagène, en raison de sa structure cyclique, qui confère une grande rigidité aux peptides dont elle fait partie. Son hydroxyle réalise des pontages intra et interchaines, permettant encore d'accroître la solidité des peptides du collagène. Il est en outre responsable de la fixation des cristaux d'apatite autour du collagène osseux. Cet hydroxyle est en effet estérifié par un radical orthophosphorique, sur lequel se fixent les ions calcium. Grâce à l'hydroxyproline, chaque fibre du collagène osseux sert de centre de cristallisation au phosphate de calcium et dirige la formation des travées osseuses. Cela explique l'abondance tout à fait particulière du collagène dans l'os.

On voit que l'hydroxyproline n'apparaît dans les liquides biologiques qu'après avoir été synthétisée pendant la formation du collagène. Toutefois, on ne peut affirmer que l'hydroxyproline des liquides biologiques provienne du collagène vieilli, ayant accompli la totalité de sa durée de vie. Il existe, nous le verrons, des indices troublants d'un rapport entre cette hydroxyproline des liquides biologiques et les formes jeunes, immatures, de collagène. Nous n'en citerons qu'une preuve : l'hydroxyproline existe dans le sérum sanguin et l'urine des adolescents en quantités beaucoup plus fortes que chez les adultes et les vieillards.

Il est probable que l'hydroxyproline éliminée dans l'urine provient, au moins en partie, d'une fraction du collagène jeune, en cours de synthèse. Les

exemples de biosynthèses partiellement abortives existent déjà : citons la biosynthèse de l'hème, fournissant classiquement une petite quantité de stercobiline avant toute incorporation dans les globules rouges.

L'hydroxyproline a donc été, de toutes façons, initialement, un constituant d'un peptide, de collagène soluble (tropocollagène) ou enfin de collagène insoluble. Pour qu'elle ait été entraînée dans le courant sanguin, il faut qu'existent des mécanismes de solubilisation : probablement, des cathepsines agissent dans le tissu conjonctif pour fractionner le collagène en peptides (76).

On a isolé du sérum sanguin une protéine ou un très gros peptide à hydroxyproline (34). C'est probablement la forme, ou l'une des formes sous laquelle l'hydroxyproline quitte le tissu conjonctif.

Il est vraisemblable que ce peptide est catabolisé plus avant par les peptidases hépatiques. La séparation de l'hydroxyproline nécessite l'intervention de peptidases spécifiques, les prolidases et prolinases. Le foie est capable de réutiliser ou de détruire les acides aminés libérés à partir de ces peptides. Dans le cas de l'hydroxyproline, il existe une voie de dégradation parfaitement établie (17).

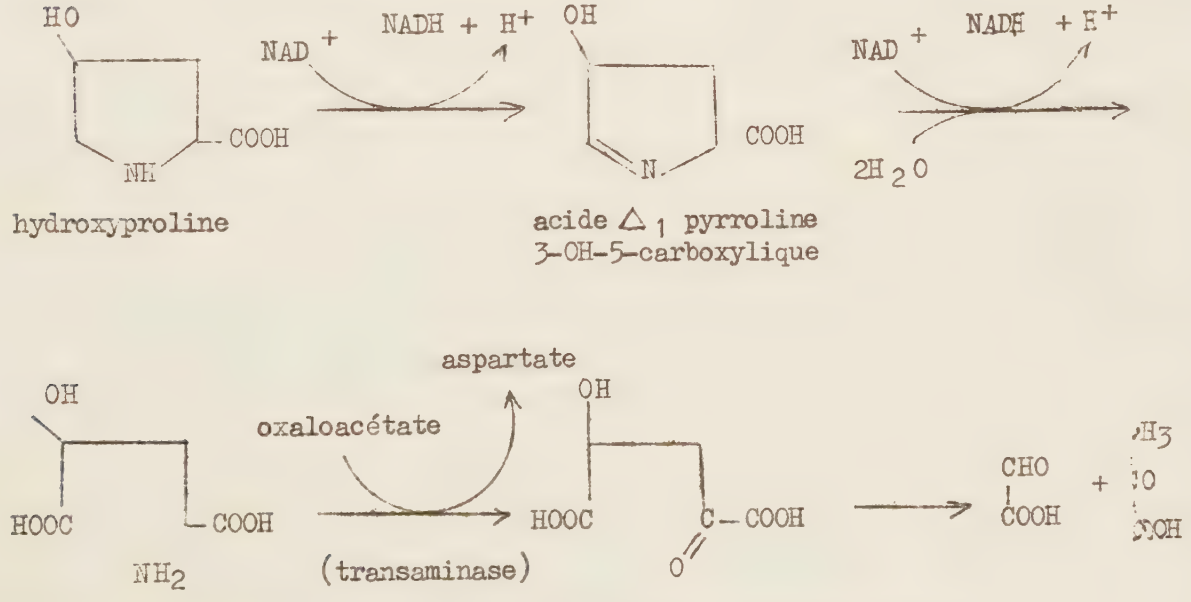


Figure 1 : Catabolisme de l'hydroxyproline (reproduit de GOLDSTONE (17).

On voit que les éléments constitutifs de l'hydroxyproline rejoignent le métabolisme général du foie et sont susceptibles de contribuer à la production d'énergie.

Cependant, l'expérience prouve que le sérum et l'urine contiennent des petits peptides à hydroxyproline et même de l'hydroxyproline à l'état libre. C'est donc que toute l'hydroxyproline n'est pas détruite dans le foie et qu'il existe un mécanisme de clearance rénale pour ces substances, comme du reste pour un grand nombre de peptides d'autres origines.

Il n'est pas exclu que certains petits peptides à hydroxyproline provenant du collagène alimentaire puissent aussi être absorbés tels quels par le tube digestif et ne pas être attaqués par le foie. Ils seraient ainsi éliminés par l'urine, participant à l'hydroxyprolinurie.

On voit que le taux d'hydroxyproline urinaire est le reflet de l'activité métabolique du collagène. C'est avant tout le collagène osseux qui contribue à fournir l'hydroxyproline urinaire et c'est pourquoi le dosage de l'hydroxyprolinurie a intéressé un grand nombre de chercheurs et de cliniciens.

Nous allons envisager d'abord les techniques proposées par de nombreux auteurs afin de doser l'hydroxyproline urinaire sous ses diverses formes, puis la mise en évidence et le fractionnement des différents peptides urinaires. Ensuite, nous exposerons nos propres méthodes de dosage et de fractionnement des peptides urinaires à hydroxyproline.

Enfin, nous étudierons la valeur sémiologique de l'hydroxyprolinurie, telle qu'on peut la définir à partir de l'expérience des autres auteurs et de notre propre expérience. Nous donnerons notamment les résultats d'une centaine de dosages personnels.

PLAN PROPOSE

PREMIERE PARTIE

- METHODES DE DOSAGE ET DE CARACTERISATION DE L'HYDROXYPROLINE URINAIRE

A - METHODES DE DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE URINAIRE

1 - Dosages utilisant la ninhydrine

2 - Dosages utilisant le para dimethyl amino-benzaldéhyde

a) Méthode de NEUMAN et LOGAN

b) Méthodes dérivant directement de celle de NEUMAN et LOGAN.

c) Méthodes comportant des modalités particulières.

3 - Dosages des diverses fractions d'hydroxyproline urinaire.

a) L'hydroxyproline totale.

b) L'hydroxyproline libre.

B - CARACTERISATION DES DIVERS PEPTIDES URINAIRES CONTENANT DE L-HYDROXY-PROLINE.

1 - Mise en évidence de ces peptides.

2 - Structure de ces peptides.

DEUXIEME PARTIE

- NOS TECHNIQUES

A - HYDROXYPROLINES TOTALE ET LIBRE.

1 - Méthode générale de dosage de l'hydroxyproline.

a) Réactifs utilisés

b) Dosage

c) Résultats

d) Causes d'erreurs et composés interférents :

- le pH
- les sels minéraux
- les acides aminés

2 - Dosage de l'hydroxyproline totale

a) Conditions d'hydrolyse

b) Préparation des hydrolysats en vue du dosage

c) Dosage

d) Composés interférents

e) Résultats normaux.

3 - Dosage de l'hydroxyproline libre

a) Protocole

b) Vérifications expérimentales

c) Composés interférents

d) Comparaison avec d'autres méthodes

e) Résultats normaux.

B - SEPARATION DES DIVERSES FORMES D'HYDROXYPROLINE PEPTIDIQUES.

1 - Séparation des peptides à hydroxyproline

2 - Nature chimique des deux fractions de peptides à hydroxyproline.

TROISIEME PARTIE

- VALEUR SEMIOLOGIQUE DES DOSAGES D'HYDROXYPROLINE URINAIRE

A - RESULTATS DES DOSAGES : ETUDE COMPARATIVE DE LA LITTERATURE ET DE NOS PROPRES RESULTATS.

1 - L'hydroxyprolinurie dans les maladies des glandes endocrines.

2 - L'hydroxyprolinurie dans les maladies des os.

3 - L'hydroxyprolinurie en rhumatologie.

4 - L'hydroxyprolinurie dans les collagénoses

5 - L'hydroxyprolinurie au cours d'affections diverses.

6 - L'hydroxyprolinurie chez les enfants.

B - PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ELEVATION DE L'HYDROXYPROLINE URINAIRE ET DE SES DIVERSES FRACTIONS.

CONCLUSION

PREMIERE PARTIE :

METHODE DE DOSAGE ET DE CARACTERISATION DE L'HYDROXYPROLINE URINAIRE.

L'hydroxyproline urinaire a suscité d'innombrables travaux en raison de son intérêt sémiologique et il en existe de très nombreuses méthodes de dosage, car il s'agit d'un dosage difficile, un grand nombre de substances contenues dans les urines étant capables d'interférer.

Nous passerons en revue les principales méthodes déjà décrites. Si l'on excepte les méthodes bactériologiques, dont nous ne parlerons pas ici, les autres méthodes sont colorimétriques et se rattachent toutes à deux types : la réaction de l'hydroxyproline avec la ninhydrine d'une part, son oxydation en pyrrole, suivie de la condensation de celui-ci avec le réactif d'EHRLICH d'autre part.

C'est essentiellement l'hydroxyproline totale qu'ont dosée les divers auteurs cités plus loin. L'hydroxyproline libre a été plus rarement étudiée. D'autre part, si les formes peptidiques de l'hydroxyproline urinaire ont été analysées depuis longtemps, il ne semble pas qu'une étude systématique de leurs variations pathologiques ait été entreprise. Nous situerons l'état des travaux touchant à cette question, avant de faire part de quelques résultats personnels.

A - LES METHODES DE DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE URINAIRE

1 - Dosages utilisant la ninhydrine :

L'utilisation de la ninhydrine dans le dosage des acides aminés est courante. L'hydroxyproline présente des modalités réactionnelles particulières du fait qu'il s'agit d'un acide iminé et non pas aminé. Le produit de condensation entre la ninhydrine et l'hydroxyproline est coloré en jaune : il diffère donc fortement des substances colorées formées dans la réaction de la ninhydrine avec les acides aminés, qui ont été récemment étudiées par chromatographie (38). Une telle étude reste à faire dans le cas de l'hydroxyproline.

La réaction manque fondamentalement de spécificité puisqu'elle est identique à celle de la proline. En outre, les acides aminés, par la coloration violette qu'ils donnent dans la même réaction, interfèrent. Cette réaction colorée n'a donc pu être appliquée au dosage de l'hydroxyproline que dans la mesure où celle-ci est au préalable séparée des autres acides aminés.

De ce fait, la réaction ne présente guère d'intérêt dans le cas de l'hydroxyproline urinaire et la méthode classique de dosage des acides aminés et iminés, de TROLL et CANNAN (74) par exemple, n'a pas été utilisée à cette fin.

Par contre, la réaction avec la ninhydrine reste une bonne méthode de dosage de l'hydroxyproline séparée préalablement des substances interférentes par une méthode physique.

C'est ainsi que BOULANGER et ses collaborateurs ont décrit de 1950 à 1955 une série de méthodes de fractionnement des acides aminés et des peptides des liquides biologiques, par chromatographie de partage sur papier, suivie de révélation par la ninhydrine, d'élution des taches, de colorimétrie des éluats colorés (6). Les peptides à hydroxyproline sont caractérisés, après divers modes de séparation électrophorétique, par hydrolyse et chromatographie de l'hydrolysat (56).

Cette méthode a permis de montrer que l'hydroxyproline n'existait à l'état libre, dans les urines normales, chez l'adulte comme chez l'enfant et le nourrisson, que sous forme de traces. Par contre, dans sa thèse, Melle COMBAUD (9) mettait déjà en évidence une forte élimination urinaire pathologique d'hydroxyproline libre chez certains nouveaux-nés. Il est possible de révéler spécifiquement l'hydroxyproline en chromatographie sur papier, selon la méthode de JEPSON et SMITH (25) par pulvérisation d'isatine suivie de para dimethyl amino-benzaldéhyde en solution acide. Quant aux formes liées d'hydroxyproline, PLAQUET (57) démontrait qu'il s'agissait de peptides dans lesquels prédominait l'enchaînement prolyl-hydroxyproline.

Plus récemment, la chromatographie en couche mince a fourni d'autres moyens de caractériser l'hydroxyproline urinaire (50).

Enfin, les travaux de MOORE et STEIN permirent d'utiliser la chromatographie sur résine échangeuse d'ions afin de séparer les divers acides aminés ou peptides. Ces méthodes se prêtent très bien à l'évaluation quantitative des acides iminés. La méthode a été portée à son plus haut degré de sensibilité et de précision par l'introduction des analyseurs automatiques.

Ces méthodes, tant de chromatographie sur papier, que sur colonne, permettent donc d'analyser simultanément toutes les substances aminées ou iminées de l'urine. Il est cependant de nombreux cas, en chimie clinique, où cette analyse globale paraît inutile, car trop complète. Si l'on veut limiter l'étude des substances azotées urinaires à la seule hydroxyproline, il faut avoir recours à un dosage plus spécifique.

2 - Modes de dosage de l'hydroxyproline utilisant le para dimethyl amino-benzaldehyde

C'est précisément dans l'urine qu'EHRLICH découvrit la réaction colorée qui a pris son nom. En 1901 en effet, il décrivit la coloration rouge que certaines urines pathologiques donnaient avec le para dimethylamino-benzaldehyde en solution acide. NEUBAUER et PAPPENHEIM démontrèrent en 1903 que la substance réagissante était l'urobilinogène, et que tous les pyrroles ayant les positions α ou α' libres donnaient cette réaction (18). En 1933, LANG eut le mérite de montrer que l'hypochlorite oxydait l'hydroxyproline en pyrrole (39). Ce n'est cependant qu'en 1950 qu'apparut une méthode de dosage de l'hydroxyproline par oxydation suivie d'action du para dimethylamino-benzaldehyde : la méthode de NEUMAN et LOGAN (52). Par la suite, toutes les techniques se sont inspirées de ce travail princeps, avec des modifications de détail améliorant la sensibilité ou la spécificité.

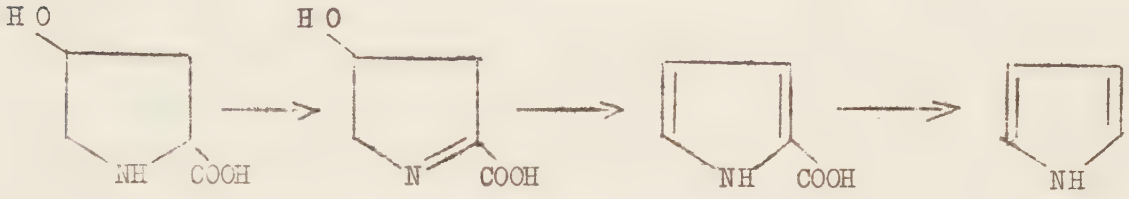
Nous allons examiner la méthode de NEUMAN et LOGAN, les méthodes qui en dérivent directement, et enfin certaines méthodes plus sensibles qui ont apporté des améliorations supplémentaires.

a) La méthode de NEUMAN et LOGAN :

Principe :

D'après RADHAKRISHNAN et MEISTER (63) et d'après PROCKOP et

UDENFRIEND (62) l'hydroxyproline est d'abord oxydée en acide 1-pyrroline-4-hydroxycarboxylique, puis en acide pyrrole-2-carboxylique et enfin, dans certains cas en pyrrole. Le degré de transformation dépend de la force de l'oxydant, de la température et du pH.

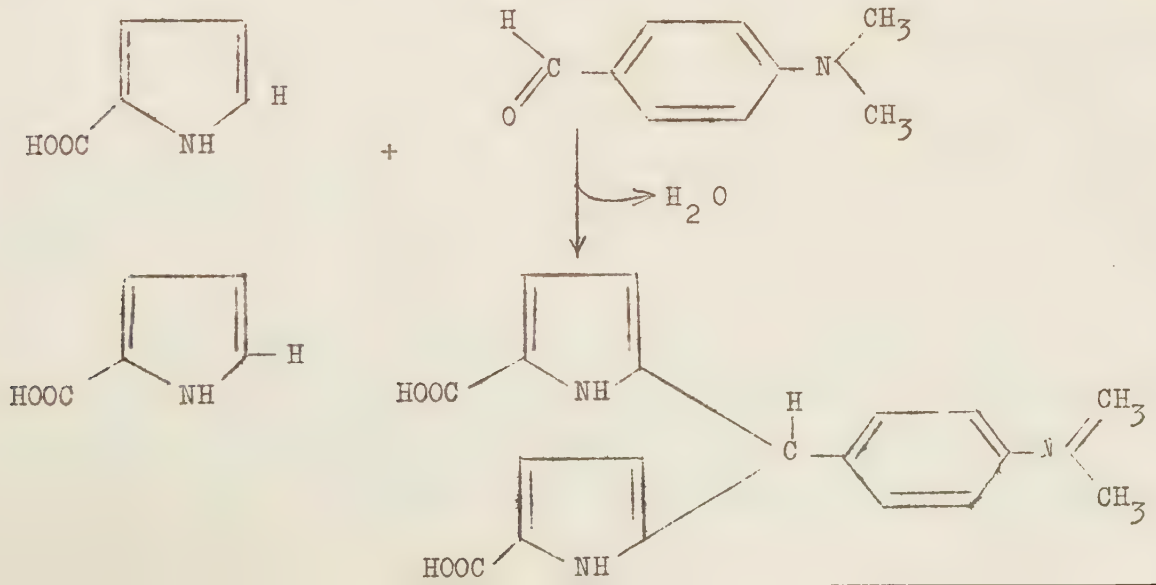


hydroxyproline — acide 1 pyrroline 4 hydroxycarboxylique. — acide pyrrole-2-carboxylique. — pyrrole

Remarquons que les isomères de l'hydroxyproline comme l'allohydroxyproline et la 3-hydroxyproline donneront la même réaction.

Dans leur méthode, NEUMANN et LOGAN utilisent comme oxydant l'eau oxygénée en présence d'ions cuivriques. Cette oxydation a lieu en milieu assez fortement alcalin (Na OH en solution 1,0 N).

L'eau oxygénée en excès est ensuite détruite par chauffage. Le pH est rendu très acide par addition d'un acide fort, et le pyrrole réagit avec le para dimethylamino-benzaldehyde, à chaud. L'acide joue le rôle de déshydratant. Bien que le mécanisme exact de la réaction n'ait pas été défini, on pourrait le schématiser de la façon suivante, qui reste purement hypothétique:



Cette substance est colorée en rouge. Ses solutions acides sont stables pendant une heure environ et suivant la loi de BEER-LAMBERT dans un intervalle de concentration important.

Cette interprétation de la réaction colorée a été critiquée, en particulier par BERGMAN et LOXLEY (2) qui ont montré que le pyrrole et l'acide pyrrole-2-carboxylique ne donnent pas de coloration avec le para dimethylamino-benzaldehyde. Quant à l'acide 1 pyrroline-4-hydroxy-2-carboxylique, des arguments indirects paraissent également le mettre hors de cause. On peut donc se demander quel est le mécanisme exact de cette réaction si utilisée empiriquement.

Quoi qu'il en soit, les composés porteurs d'un noyau pyrrole avec une position α libre donneront la même réaction colorée. Cela n'avait pas d'importance dans le cas du dosage de l'hydroxyproline provenant d'hydrolysats de collagène ou de gélatine, pour lequel NEUMAN et LOGAN avaient établi leur technique. Il n'y a pas, en effet, dans ces préparations, d'autres pyrroles susceptibles d'interférer.

Par contre, l'urine contient certains pyrroles, comme les porphyrines, certains dipyrroles provenant des pigments biliaires, des dérivés indoliques, des acétylosamines qui sont capables d'interférer. La méthode de NEUMAN et LOGAN ne luiest pas directement applicable.

Réalisation :

Dans leur technique, NEUMAN et LOGAN (52) utilisent une solution de SO_4 Cu 0,01 M, une solution de Na OH 2,5 N et une solution d'eau oxygénée à 6 pour cent. Des volumes de 1 ml de chacun de ces réactifs sont mélangés à 1 ml de solution d'hydroxyproline à doser et agités pendant 5 minutes à température ordinaire. Le pyrrole se forme. Le mélange est ensuite placé au bain-marie à 80°C pendant 5 minutes, ce qui provoque la destruction de l'excès d'eau oxygénée.

Ainsi l'oxydation du pyrrole est obtenue en solution 0,625 N en Na OH. La condensation du paradiméthylamino-benzaldéhyde avec le pyrrole est réalisée pour une normalité en acide sulfurique libre de 1,0. Nous verrons que ces valeurs seront fortement modifiées dans plusieurs méthodes de dosage dérivées de celle-ci.

b) Méthodes dérivant directement de celle de NEUMAN et LOGAN :

La première en date est celle de MARTIN et AXELROD (44) en 1953. Ces auteurs détruisent l'excès d'eau oxygénée après oxydation de l'hydroxyproline en pyrrole, par addition de 0,1 ml de solution de sulfate ferreux 0,05 M. Ils ont en effet constaté que le stade de chauffage destiné à éliminer l'excès d'eau oxygénée dans la méthode de NEUMAN et LOGAN provoquait des irrégularités dans l'intensité de la coloration formée. Ils utilisent par ailleurs un volume de prise d'essai de 2 ml au lieu de 1 ml. De ce fait, l'oxydation de l'hydroxyproline est réalisée en solution de Na OH 0,50 N et la condensation du pyrrole avec le para diméthylamino-benzaldéhyde en solution de SO_4H_2 approximativement 1,2 N.

Nous n'avons pas eu recours à cette modification parce que l'oxydation par l'eau oxygénée à chaud nous a toujours fourni des résultats reproductibles. Du reste, cette méthode n'a guère été employée ultérieurement à sa description.

On trouve ensuite la méthode de HUTTERER et SINGER (22) (1960). Cette méthode apporte plusieurs modifications heureuses, que nous avons adoptées dans nos propres dosages.

Les volumes des réactifs sont adaptés de la façon suivante : solution à doser 1 ml, solution de SO_4 Cu 0,05 M 0,2 ml, solution de Na OH 2,5 N 0,5 ml, solution d'eau oxygénée à 4/100 (p/v) 0,5 ml, soit un volume de 2,2 ml et une normalité finale en Na OH de l'ordre de 0,57 N.

L'oxydation est pratiquée à température ordinaire, suivie de l'élimination de l'excès d'eau oxygénée au bain-marie à 70°C pendant 10 minutes. Ces auteurs complètent l'élimination de H_2O_2 en soumettant les tubes à une aspiration sous vide. Nous avons constaté qu'une bonne agitation des tubes au cours du chauffage suffisait à éliminer l'excès d'H_2O_2.

Après refroidissement, on ajoute 0,8 ml de solution de SO_4H_2 8 N et 2,5 ml de solution de para diméthylamino-benzaldéhyde à 5/100 (p/v) dans l'alcool propylique. La normalité de la solution finale d'acide sulfurique est donc environ 0,88 N. La concentration de para diméthylamino-benzaldéhyde

est légèrement augmentée par rapport aux proportions de NEUMAN et LOGAN. La réaction colorée se développe en 40 minutes au bain-marie à 70°C.

En outre, ces auteurs ont introduit une correction des interférences provoquées par les colorations parasites : ils pratiquent une double spectrophotométrie à 560 et à 500 mμ. C'est en effet dans le jaune que se place le pic d'absorption des substances interférentes.

La densité optique corrigée est obtenue par utilisation de la relation suivante :

$$X = D_{560} \left[\frac{D_{500} - (D_{560} \times R)}{Q - R} \right]$$

D = densité optique des échantillons inconnus.

Les coefficients Q et R ne sont autres que les rapports des densités optiques du pigment formé par réaction de l'hydroxyproline témoin dans les mêmes conditions.

$$Q = \frac{A\ 560}{A\ 500} \text{ des standards.}$$

$$R = \frac{A\ 500}{A\ 560} \text{ des standards.}$$

On remarque que cette formule, appliquée à une solution standard, doit toujours donner une correction nulle.

HUTTERER et SINGER ont montré que la valeur de R était 0,4000 $\pm$ 0,0074. Si une solution témoin donne une valeur de R différente, c'est qu'il existe des impuretés dans les réactifs. C'est en particulier le cas pour le para diméthylamino-benzaldéhyde. La vérification de la valeur de R pour plusieurs concentrations d'hydroxyproline témoin permet donc d'évaluer la pureté de la solution d'hydroxyproline.

Naturellement $Q = \frac{1}{R}$

Enfin, la dernière modification de la méthode de NEUMAN et LOGAN proposée est celle de LEACH (1960), (40) qui se contente de modifier la teneur de la solution en SO_4Cu.

Nous avons réuni sur un tableau les données relatives à chacun de ces modes de dosages (tableau I). On voit que les concentrations des divers réactifs peuvent varier dans certaines limites sans affecter la réaction finale.

SOLUTIONS	NEUMAN et LOGAN (52)	MARTIN et AXELROD (44)	HUTTERER et SINGER (22)	LEACH (40)
vol. de sol. inconnue	1 ml	2 ml	1 ml	1 ml
vol. de sol. de SO_4 Cu	1 ml sol. 0,01 M	1 ml sol. 0,01 M	0,2 ml sol. 0,05 M	1 ml sol. 0,05 M
vol. de sol. de Na OH	1 ml sol. 2,5 N	1 ml sol. 2,5 N	0,5 ml sol. 2,5 N	1 ml sol. 2,5 N
vol. de sol. de $H_2 O_2$	1 ml sol. 6/100	1 ml sol. 6/100	0,5 ml sol. 4/100	1 ml sol. 6/100
vol. de sol. de SO_4Fe	0	0,1 ml sol. 0,05 M	0	0
vol. de sol. au cours de l'oxydation	4 ml	5,1 ml	2,2 ml	4 ml
normalité de cette sol. en Na OH	0,625 N	0,5 N	0,57 N	0,625 N
vol. de sol. d'acide sulfurique	4 ml sol. 3 N	4 ml sol. 4 N	0,8 ml sol. 8,0 N	4 ml sol. 3 N
vol. de sol. de p.D A B	2 ml sol. 5/100	2 ml sol. 4/100	2,5 ml sol. 5/100	2 ml sol. 5/100
vol. final	10 ml	11,1 ml	5,5 ml	10 ml
normalité finale en $SO_4 H_2$ libre	1,0 N	1,2 N	0,885 N	1,0 N

TABLEAU I : Comparaison entre les proportions des réactifs pour le dosage de l'hydroxyproline.

c) Méthodes basées sur la réaction de condensation du pyrrole avec le para diméthylamino-benzaldéhyde et comportant des modalités particulières.

SERAFINI-CESSI et CESSI (69) ont décrit une méthode de distillation du pyrrole formé par oxydation de l'hydroxyproline. L'oxydation est menée dans des conditions strictement identiques à celles de NEUMAN et LOGAN. On ajoute ensuite 2 ml de solution saturée de KCl, 1 ml de solution de ClH 3 N et 10 mg de Cl_2 Sn en cristaux. On distille dans un petit appareil facile à réaliser (une simple colonne de Vigreux de quelques centimètres de haut suivie d'un réfrigérant de longueur identique. Les 3,5 premiers ml de distillat sont recueillis dans une fiole jaugée de 10 ml contenant 6,5 ml de réactif d'EHRLICH. Ce dernier est préparé par dissolution de 1 g de para diméthylamino-benzaldéhyde dans un mélange de 55 ml d'acide acétique concentré et 10 ml de solution d'acide sulfurique 10 N. La coloration rouge apparaît immédiatement. Elle suit la loi de BEER LAMBERT pour l'intervalle de concentrations de 2 à 10 μ g.

Cette technique a été établie afin de doser l'hydroxyproline d'hydrolysats de collagène. Nous l'avons personnellement utilisée dans certains cas afin de controler nos propres méthodes. Nous verrons qu'elle ne peut s'appliquer à l'urine qu'avec de sérieuses réserves.

Un certain nombre d'auteurs, à la suite de STEGEMANN (73) ont utilisé comme système oxydant la chloramine T à la place du mélange eau oxygénée-SO_4 Cu. La méthode a été perfectionnée par DAHL et PERSSON (10) et surtout par WOESSNER (77). Ce dernier décrit deux variantes dont l'une est une semi-microméthode. Il utilise des solutions très étroitement tamponnées. La chloramine T est dissoute dans le méthyl-cellosolve. Après oxydation, l'excès de chloramine T est détruit par addition d'acide perchlorique, qui permet en même temps de porter la solution au pH acide nécessaire au développement de la réaction colorée avec le para diméthylamino-benzaldéhyde, qui est dissous dans le méthyl-cellosolve.

WOESSNER signale que divers acides aminés interfèrent avec la réaction à des taux élevés, en particulier la cystéine, la proline, l'ornithine.

Cette méthode a l'avantage de permettre le dosage de l'hydroxyproline en très faibles quantités au sein de mélanges d'acides aminés en solutions concentrées. Elle est donc très utile pour le dosage de l'hydroxyproline dans des hydrolysats de protéines autres que le collagène. Elle présente moins d'intérêt pour le dosage de l'hydroxyproline de l'urine, où les taux d'acides aminés sont relativement faibles.

La technique de STEGEMANN a eu le mérite de servir de point de départ à un autre groupe de techniques, basées sur l'extraction de l'acide pyrrole-carboxylique. Elles présentent un réel intérêt car leur spécificité paraît beaucoup plus marquée. La colorimétrie est pratiquée sur un extrait ayant en principe une composition constante. Seules, les substances transformées en pyrrole au cours du stade d'oxydation peuvent encore interférer.

Les diverses méthodes d'extraction ont été décrites par UDENFRIEND et ses collaborateurs en 1959 et 1960. Tout d'abord, cette équipe a constaté que l'éther permettait d'extraire quantitativement l'acide pyrrole carboxylique formé au cours de l'oxydation de l'hydroxyproline par le sulfate de cuivre et l'eau oxygénée (48). La réaction colorée est effectuée sur l'extrait éthéré. Cette méthode améliore la sensibilité du dosage ; mais elle ne lève pas l'interférence produite par d'autres pyrroles.

PROCKOP et UDENFRIEND ont alors perfectionné la méthode (62). L'oxydation de la solution à doser est réalisée par la chloramine T en présence d'un excès de ClK, en solution tampon borate de pH 8,7 et en présence d'une quantité importante d'alanine, qui régularise l'oxydation et rend la réaction indépendante de la quantité d'acides aminés présente. Dans un premier temps, la solution est oxydée à froid pendant 20 minutes ; puis l'oxydation est arrêtée par addition de thiosulfate de sodium. A ce stade un certain nombre de substances interférentes sont transformées en pyrrole, mais l'hydroxyproline n'est pas encore oxydée. On extrait ces pyrroles par le toluène à plusieurs reprises.

On chauffe ensuite la solution restante à 100°C pendant une demi-heure : cette fois, l'hydroxyproline est totalement oxydée et transformée en pyrrole. Celui-ci est alors extrait par un volume connu de toluène. Le réactif

d'EHRLICH (solution de para diméthylamino-benzaldéhyde dans un mélange d'alcool éthylique et d'acide sulfurique concentré) est finalement ajouté. La réaction colorée se développe immédiatement.

Cette méthode est très précise, sensible et élimine beaucoup d'interférences, en particulier celles que provoquent les acides aminés et les sels minéraux. Il ne semble pas que l'interférence produite par les acétylosamines et l'acide sialique ait été étudiée par cette méthode. Nous verrons que c'est la cause d'interférence la plus génante dans le dosage de l'hydroxyproline libre de l'urine. UDENFRIEND a encore amélioré sa méthode en la couplant avec la technique de dilution isotopique.

La seule objection contre cette méthode est sa difficulté ainsi que la longueur des manipulations nécessaires. C'est la raison pour laquelle un grand nombre de laboratoires de chimie clinique n'ont pu l'adopter. Nous-mêmes avons préféré établir des méthodes de purification des diverses fractions d'hydroxyproline avant oxydation de celle-ci et n'avons pas utilisé la méthode d'extraction par le toluène. Nous n'en avons donc pas l'expérience et ne pouvons en faire état davantage.

3 - Dosage des diverses fractions d'hydroxyproline urinaire

a) L'hydroxyproline totale :

Elle est naturellement dosée après hydrolyse. Quelques auteurs emploient l'hydrolyse par la baryte (48). L'hydrolyse chlorhydrique est la plus employée ; ses modalités sont assez variables. Le tableau 2 résume les molarités de ClH, les durées et les températures indiquées dans diverses publications.

On voit que presque tous les auteurs utilisent une solution de ClH 6 N. Cette normalité est facile à obtenir, car elle résulte pratiquement du mélange à volumes égaux de ClH concentré et de la solution à hydrolyser. L'acide chlorhydrique ne paraît pas contenir de substances interférentes : personne n'a signalé un tel fait, quel que soit l'acide utilisé. Il n'est donc pas nécessaire de le redistiller.

AUTEURS	ClH	TEMPS	TEMPERATURE	MATERIEL
BENOIT (1)	6 N	12 h	autoclave	urine
DULL (12)	6 N	3 h	126°C	urine
GOIDANICH (16)	6 N	24 h	100°C	urine
HUTTERER (22)	3 N	8 h	autoclave 1,5 atm.	tissus
KLEIN (33)	6 N	3 h	121°C	urine
KOEVOET (37)	6 N	3 h	120°C	urine
NEUMAN (52)	6 N	3 h	autoclave 3,5 atm.	collagène
PIGMAN (27)	6 N	3 h	124°C	urine
PROCKOP et UDENFRIEND (62)	6 N	3 h	124°C	urine et tissus

TABLEAU 2 : Modalités d'hydrolyse de l'hydroxyproline combinée.

La température et la durée d'hydrolyse varient en sens inverse. Elles se situent entre 3 h à 126°C et 24 h à 100°C. L'étude systématique de l'influence de la durée et de la température d'hydrolyse sur la récupération d'hydroxyproline a rarement été faite à l'exception d'HUTTERER (22) qui en donne une rapide évaluation graphique.

Après l'hydrolyse, la plupart des auteurs procédent à l'évaporation à sec d'une portion aliquote d'hydrolysat, suivie de reprise par un volume connu d'eau distillée. Les réactifs colorimétriques sont ensuite ajoutés selon les modalités résumées plus haut.

Certains, à la suite de NEUMAN et LOGAN, neutralisent une fraction aliquote d'hydrolysat par une solution de Na OH suffisamment concentrée, puis amènent à un volume défini et procèdent à la colorimétrie sur cette solution.

Dans les méthodes de dosage de l'hydroxyproline sans extraction par le toluène ou sans distillation, la colorimétrie est rendue souvent difficile par l'humine, pigment brun qui se forme au cours de l'hydrolyse, en particulier quand le volume urinaire des 24 h. est faible. Pour éviter l'apparition d'humine, GOIDANICH a préconisé de fixer au préalable les pigments urinaires sur charbon végétal.

Pour éviter l'apparition de ces colorations parasites, on peut utiliser la méthode de mesure de la densité optique à deux longueurs d'onde de HUTTERER et SINGER ou encore la méthode de KOEVOET (37) qui soustrait à la densité optique de l'échantillon coloré, la densité optique obtenue par réaction de l'hydrolysat avec le para diméthylamino-benzaldéhyde sans oxydation préalable. Ceci permet évidemment de supprimer l'interférence provoquée par les substances autres que l'hydroxyproline capables de s'oxyder en pyrrole, mais cela n'élimine pas l'influence des composés qui s'oxydent en pyrrole en même temps qu'elle.

Résultats :

Nous indiquerons ici les valeurs normales établies par un grand nombre d'auteurs (tableau 3). Nous discuterons dans la dernière partie de ce travail, les valeurs pathologiques.

On remarque que les valeurs normales ne sont pas sensiblement différentes selon les méthodes de dosage. Dans l'ensemble, ces valeurs sont comprises entre 15 et 40 mg par 24 h. Certains auteurs trouvent des valeurs systématiquement plus faibles. C'est le cas de SATWEKAR (67) dont les dosages sont pratiqués aux Indes. Il serait intéressant de savoir si un facteur racial peut expliquer ces taux très faibles. Dans le cas contraire on pourrait invoquer le facteur alimentaire.

A l'inverse, PIGMAN et ses collaborateurs (27) trouvent des résultats beaucoup plus élevés que les autres auteurs au cours d'une étude très

AUTEURS	TAUX NORMAUX (valeurs extrêmes normales en mg/24 heure)		METHODE DE DOSAGE
	enfant et adolescent	adulte	
BENOIT (1)		13-45	PROCKOP et UDENFRIEND
BONNADONNA (5)		18-32	"
DULL (12)	27-103	8-40	"
GOIDANICH (16)	50-80	15-20	NEUMAN et LOGAN
(GRUSSON et de SEZE (20)		15-35	WOESSNER
JASIN (24)	21-169	14,5-54,6	PROCKOP et UDENFRIEND
KIVIRIKKO (32)		15-46	"
KLEIN (49)		10-50	NEUMAN et LOGAN
KLEIN (35)		18-38	PROCKOP et UDENFRIEND
MITOMA (48)		14-38	1ère méth. UDENFRIEND
(JONES et PIGMAN (27)	100-350	50-80	PROCKOP et UDENFRIEND
PLATT (58)		9-28	"
PROCKOP (62)		15-62	"
RAVENNI (64)		28	NEUMAN et LOGAN
SATWEKAR (67)		11	"
SMITH (72)		25-35	PROCKOP et UDENFRIEND
ZIFF (78)	15-150	15-33	WISS

TABLEAU 3 : Valeurs de l'hydroxyproline urinaire totale indiquées dans la littérature.

complète des variations de l'hydroxyprolinurie en fonction de l'âge. Nous ne savons pas quelle explication on peut donner de ce décalage, la technique utilisée étant celle de PROCKOP et UDENFRIEND qui a donné des résultats beaucoup plus faibles entre les mains das autres auteurs.

Chez l'enfant et l'adolescent, le taux de l'hydroxyprolinurie physiologique est beaucoup plus élevé : il atteint le double de celui de l'adulte. Là encore, PIGMAN (27) donne des valeurs plus fortes que les autres auteurs, mesurées sur une très grande série de sujets ce qui lui a permis de classer les résultats en fonction de l'âge. L'excrétion d'hydroxyproline totale est maximale à l'âge de 14 à 15 ans.

b) L'hydroxyproline libre : cette forme d'hydroxyproline urinaire a été peu étudiée. Un certain nombre d'auteurs en ont nié l'existence parce que son dosage direct est impossible.

La première méthode capable de dépister l'hydroxyproline libre et d'en donner au moins une appréciation semi-quantitative est la chromatographie sur papier ou encore la chromato-électrophorèse. L'équipe du Pr. BOULANGER a ainsi étudié à plusieurs reprises l'hydroxyprolinurie, en particulier chez le nourrisson (56, 57) et a montré que l'élimination était normalement très faible, mais pouvait s'élever chez le nourrisson malade jusqu'à des taux importants.

Par la suite, un grand nombre d'auteurs ont tenté de doser l'hydroxyproline libre de l'urine en la soumettant directement à la réaction de NEUMAN et LOGAN. Ces essais aboutissent toujours à un échec, probablement parce que l'urine contient un grand nombre de substances oxydables en compétition avec l'hydroxyproline, tandis que les pigments normaux interfèrent avec le stade colorimétrique proprement dit. Nous avons vérifié nous-mêmes que la réaction de NEUMAN et LOGAN ne donnait aucun résultat dans l'urine totale. Pour cette raison, un grand nombre d'auteurs ont affirmé qu'il n'existait pas d'hydroxyproline libre dans l'urine, et bien d'autres ne l'ont même pas cherchée.

Comme nous l'avons indiqué dans lechapître consacré aux techniques de dosage, SERAFINI-CESSI (69) a proposé une méthode de distillation levant les interférences. Cette méthode paraît applicable à l'hydroxyproline libre de l'urine. Elle ne nous paraît pas, néanmoins, avoir été utilisée.

C'est la méthode d'extraction différentielle par le toluène, de PROCKOP et UDENFRIEND (62) déjà décrite plus haut, qui a fourni la méthode de dosage de l'hydroxyproline urinaire libre utilisée par quelques auteurs. Les résultats, chez le sujet normal, sont de l'ordre du milligramme par 24 heures (tableau 4).

AUTEURS	TAUX NORMAUX (valeurs extrêmes normales) ou moyennes en mg/24 heures)	TECHNIQUE
GOLDANICH (16)	absente	NEUMAN et LOGAN
ZIFF (78)	0,5	WISS
DULL (12)	0,3 à 1,6	PROCKOP et UDENFRIEND
KEISER (28)	0,9	"
KIVIRIKKO (32)	0,34 à 1,57	"
KLEIN (35)	0,6	"
MITOMA (48)	0,20 à 2,15	"
PROCKOP (62)	0,5 à 1,5	"
RAVENNI (64)	0,25	"

TABLEAU 4 : Taux d'hydroxyproline urinaire libre, d'après divers auteurs.

Ce tableau montre que l'hydroxyproline libre se situe entre les valeurs 0,2 et 2,2 mg/24 heures chez le sujet normal, soit moins de 3 pour cent de l'hydroxyproline totale. Nous verrons que notre méthode nous donne des chiffres souvent plus élevés. On n'a pas signalé l'élévation de cette proportion chez l'enfant.

Dans l'ensemble, le taux d'hydroxyproline libre a peu interessé les auteurs, qui ne lui ont presque jamais consacré d'étude systématique.

c) L'hydroxyproline peptidique : son taux peut être atteint en retranchant le taux d'hydroxyproline libre à la totale. On ne l'a donc pas plus étudié que celui de l'hydroxyproline libre. On n'a pas étudié ses variations en pathologie, ni essayé de déterminer les taux de chacun des peptides qui contiennent de l'hydroxyproline. Un certain nombre d'auteurs ont établi avec précision la nature des peptides urinaires contenant de l'hydroxyproline. Nous allons maintenant passer en revue leurs travaux.

B - CARACTERISATION DES DIVERS PEPTIDES URINAIRES CONTENANT DE L'HYDROXYPROLINE

Puisque l'hydroxyproline existe sous forme de traces à l'état libre dans l'urine, tandis que l'hydrolyse fournit des quantités appréciables de cet acide iminé, c'est qu'il est éliminé sous une forme liée : soit sous forme de peptides, soit sous forme conjuguée. On n'a pas isolé jusqu'ici de glycuro ou sulfoconjugué d'hydroxyproline, par contre, on a séparé et caractérisé plusieurs peptides contenant de l'hydroxyproline.

1 - Mise en évidence de ces peptides :

Le premier auteur qui paraît avoir isolé des peptides urinaires contenant de l'hydroxyproline est CARSTEN, en 1952 (7). Il signale la présence de plusieurs peptides à hydroxyproline dans l'urine d'un sujet atteint d'arthrite rhumatismale.

WESTALL, en 1955 (75) a donné une description plus complète de l'isolement d'un peptide urinaire : après désionisation de l'urine par les résines Zéo Karb 215 et Dowex 2, il met en évidence par chromatographie sur papier une substance donnant une tache brune avec la ninhydrine. Il la sépare par chromatographie préparative sur papier et l'hydrolyse par ClH. Ceci lui permet de caractériser ses constituants, la proline et l'hydroxyproline, présents en quantités égales. Il ne s'agit pas d'une dicétopipérazine de proline et hydroxyproline, qui n'aurait pas réagi à la ninhydrine, WESTALL conclutque c'est le peptide prolyl-hydroxyproline.

Dans le cadre de leurs travaux sur les acides aminés et les peptides urinaires, BOULANGER, BIZERTE et leurs collaborateurs (6, 56) ont démontré

l'existence dans l'urine humaine d'un tripeptide ayant probablement la structure gly (pro-hypro). Ils en ont extrait de grandes quantités de l'urine d'un nourrisson rachitique, étant ainsi des premiers à se soucier de la forme d'élimination de l'hydroxyproline dans les cas d'élévation de l'hydroxyprolinurie totale.

La même année, ZIFF et collaborateurs (78) constatèrent que les peptides à hydroxyproline de l'urine étaient dialysables à raison de 90 pour cent au moins de l'hydroxyproline urinaire.

En utilisant toujours la chromatographie sur colonne d'échangeurs de cations et la chromatographie ou électrophorèse sur papier, BOULANGER et BIZERTE ont mis en évidence la présence de la dicétopipérazine de proline et hydroxyproline, en particulier dans les urines d'enfants rachitiques (57). Par conséquent, le peptide pro-hypro et sa dicétopipérazine voisinent dans l'urine. Cette coexistence, a été confirmée ultérieurement par d'autres auteurs (46, 68).

On n'a pas tardé à appliquer à l'isolement des peptides urinaires à hydroxyproline la méthode de fractionnement sur résines échangeuses d'ions décrite par MOORE et STEIN.

KIBRICK et ses collaborateurs (30,29) désionisent l'urine par une première chromatographie sur colonne de résine Dowex 50, ils éluent l'ensemble des peptides par l'ammoniaque en solution 2,0 N et pratiquent un fractionnement chromatographique complet sur Dowex 50 x 2 (200-400 meshes) en phase NH_4 avec élution par un gradient de tampon formiate d'ammonium/acétate d'ammonium du pH 3,09 jusqu'au pH 5,7.

Ils obtiennent d'abord la séparation de deux peptides contenant de l'hydroxyproline et de l'acide glutamique à partir des urines d'un sujet atteint d'arthrite rhumatismale. Ils parviennent à purifier ces peptides par chromatographie préparative sur papier avec diverses phases solvantes, en particulier une solution de butanol saturé par une solution 0,2 N d'acide trichloracétique.

Les peptides ne sont pas révélés par la ninhydrine ou l'isatine, mais

sont mis en évidence par la réaction de RYDON et SMITH (66). Leur hydrolyse montre que tous deux contiennent de la proline, de l'hydroxyproline et de l'acide glutamique, en quantités différentes.

Ces auteurs ne paraissent pas avoir mis en évidence ce type de peptides à hydroxyproline dans l'urine de sujets normaux. Ils constatent que les enchaînements d'acides aminés trouvés dans leurs deux peptides et qui ne comprennent ni l'alanine, ni le glycocolle, ne paraissent pas correspondre aux enchaînements habituels d'acides aminés du collagène. Par ailleurs, ils retrouvent aussi le dipeptide pro-hypro antérieurement mis en évidence.

NEILMAN et collaborateurs (46) reprenant la même technique dans une étude plus systématique des peptides à hydroxyproline de l'urine de sujets normaux et de malades, séparent 5 fractions. La première, contenant la substance la moins fixée à la résine Dowex 50 (pic A) serait la dicétopipérazine du peptide prolyl-hydroxyproline, la seconde ou pic B, correspondrait à l'hydroxyproline libre,la troisième, ou pic C serait un peptide présent inconstamment et en faible quantité, la suivante, ou pic D contient deux peptides à hydroxyproline, l'un neutre à l'électrophorèse, l'autre acide et contenant de l'acide glutamique comme acide aminé N terminal. La fraction suivante contient la plus grande quantité de l'hydroxyproline peptidique, sous forme du dipeptide prolyl-hydroxyproline. Enfin, la dernière fraction correspond au tripeptide gly-pro-hypro.

2 - Structure de ces peptides :

SHILEY et ZIFF, en 1964 (70), passent systématiquement en revue tous les travaux consacrés à l'isolement des peptides à hydroxyproline de l'urine par la méthode de MOORE et STEIN. Ils recensent ainsi 13 peptides à hydroxyproline dont ils rapportent la structure :

1/ Hypro-pro-gly-glu-asp-lys-leu-val-arg.
2/ Hypro-pro-gly-ala-glu-asp-lys-val-arg.
3/ Hypro-pro-gly-ala-(ou tyr)-ser-thr.
4/ Hypro-pro-gly-ala-(ou tyr)-asp-ser.
5/ Hypro-gly-ala-glu-lys-arg.

6/ Hypro (?)-ala-glu-asp.
7/ Hypro-pro-gly-asp-lys.
8/ Hypro-pro-gly-ala-asp.
9/ Hypro-glu-glu.
10/ Hypro-pro-gly.
11/ $Hypro_4$-pro_4-glu.
12/ $Hypro_2$-pro_3-glu_9.
13/ Gly-pro-hypro.

Les quantités respectives de ces peptides seraient assez variables selon les urines. Le dipeptide pro-hypro (et sa forme de cyclisation dicétopipérazique) comptent pour 60 pour cent de l'hydroxyproline totale, tandis que le tripeptide gly-pro-hypro en renferme 15 pour cent. Il serait donc intéressant de savoir si l'élévation du taux de l'hydroxyproline urinaire dépend de l'élévation proportionnelle de toutes ces formes de peptides, ou bien seulement de certains types définis. L'isolement de deux peptides à hydroxyproline contenant de l'acide glutamique dans l'urine de sujets atteints de polyarthrite chronique évolutive (45) serait en faveur de cette dernière hypothèse.

L'enchaînement gly-pro-hypro est fréquent dans le collagène de toutes les espèces animales et de l'homme lui-même. Il en est de même pour l'enchaînement pro-gly-ala. Les autres peptides ou les autres fragments de ces peptides, qui contiennent des acides aminés polaires peuvent correspondre aux parties les moins ordonnées de la molécule de tropocollagène, dont on sait qu'elles sont pauvres en pro-hypro et riches en acides aminés polaires. Ces structures correspondent donc bien à celle du collagène.

On ne peut pas affirmer, toutefois, qu'il s'agisse du collagène du sujet considéré. En effet, comme le collagène de toutes les espèces contient des enchaînements d'acides aminés identiques, il peut s'agir de peptides dérivant du collagène alimentaire.

SMILEY et ZIFF (70) ont vérifié que l'addition de quantités importantes de gélatine au régime alimentaire provoquait un accroissement de l'élimination

de peptides contenant de l'hydroxyproline. Pour cette raison, il faut pratiquer l'étude des peptides urinaires contenant de l'hydroxyproline après avoir mis le sujet à un régime peu riche en hydroxyproline.

Il serait intéressant de fractionner les peptides à hydroxyproline en se basant sur leurs différences structurales, afin, sinon de détecter les variations pathologiques du taux de chacun d'entre eux, du moins, de les étudier par groupes.

On peut sommairement classer ces peptides en 3 groupes, les neutres, du type pro-hypro et gly-pro-hypro ; ils sont prédominants, les basiques, qui contiennent par exemple un résidu d'arginine ou de lysine, et enfin les acides, contenant en particulier de l'acide glutamique. Ces derniers, précisément, n'ont été trouvés que dans des cas pathologiques. Ces différences structurales pourraient permettre un fractionnement rapide sur échangeur d'ions, adaptable aux exigences cliniques. Il semble qu'on n'a guère cherché à en tirer parti jusqu'ici. Nous indiquerons plus loin nos propres expériences.

On peut encore remarquer, en comparant les structures de ces divers peptides, que beaucoup se ressemblent : leur extrémité N terminale est analogue, il s'agit de proline. Il faut admettre, si ces peptides proviennent bien du collagène, qu'une prolidase a coupé régulièrement les liaisons N-proline. L'extrémité carboxy-terminale est plus ou moins éloignée, comme si l'action des peptidases avait été plus ou moins intense. La nature des peptides à hydroxyproline de l'urine pourrait donc refléter l'activité collagénasique de l'organisme et également, l'activité peptidasique du foie.

Depuis lors, l'étude de ces peptides à hydroxyproline a peu évolué. SATYAMAR (67) a décrit la séparation de certains peptides à hydroxyproline de l'urine de sujets atteints de sprue tropicale. Il constate qu'une partie n'est pas fixée sur Dowex 50 x 8 et que, par contre, elle est fixée sur Dowex 1 en phase OH^-. C'est là une ébauche de fractionnement intéressante, sur laquelle nous reviendrons.

Plus récemment, CHERIAN (8) a décrit l'existence dans l'urine d'un glycopeptide contenant de l'hydroxyproline et de la sarcosine. Ce peptide est

fractionné sur résine Dowex 1 x 8 en phase OH^-. Les peptides sont ensuite séparés par chromatographie sur papier. Le peptide à hydroxyproline est localisé et élué par l'eau distillé. Il est soumis à une hydrolyse qui donne par molécule d'hydroxyproline environ 1 molécule de proline, 18 d'acides aminés, 5 d'acides uroniques, 1 d'acide sialique, 1 d'hexosamine. L'un de ces acides aminés serait en fait la sarcosine. Il est encore trop tôt pour conclure, à partir d'une note préliminaire : on ne peut affirmer, en particulier, que ce peptide dérive du collagène.

L'ensemble de cette revue de la littérature nous apporte donc un certain nombre de renseignements sur les modalités efficaces de dosage de l'hydroxyproline urinaire, sur ses valeurs normales et sur la nature chimique de ses diverses formes. Nous avons mis à profit ces remarques dans nos recherches personnelles, que nous présentons maintenant.

o
o o

D E U X I E M E P A R T I E

NOS TECHNIQUES

Nous avons étudié d'une part l'élimination urinaire d'hydroxyproline totale et d'hydroxyproline libre de sujets normaux et de malades, d'autre part les variations quantitatives de plusieurs formes peptidiques d'hydroxyproline dans divers syndromes pathologiques.

Tous nos dosages se ramènent, en définitive, à un dosage d'hydroxyproline par une adaptation de la méthode de HUTTERER et SINGER décrite dans la première partie de ce travail (22). Chacune des différentes fractions d'hydroxyproline est, au préalable, séparée et purifiée par une méthode appropriée. Les fractions peptidiques de l'hydroxyproline sont soumises à une hydrolyse chlorhydrique avant dosage.

Nous décrirons d'abord notre méthode générale de dosage de l'hydroxyproline, l'hydrolyse et le dosage de l'hydroxyproline totale, la séparation et le dosage de l'hydroxyproline libre, la caractérisation des diverses fractions d'hydroxyproline peptidiques et leur dosage.

A - HYDROXYPROLINES TOTALE ET LIBRE

1 - Méthode générale de dosage de l'hydroxyproline :

a) Réactifs utilisés :

Les proportions des réactifs ont été modifiées par rapport à celles des réactifs de la méthode d'HUTTERER et SINGER afin d'augmenter le volume de la prise d'essai, et par conséquent la sensibilité du dosage.

Solution stock d'hydroxyproline :

obtenue par dissolution de 100 mg de DL-hydroxyproline Sigma dans 100 ml de solution de ClH 0,1 N.

Cette solution se conserve 15 jours au réfrigérateur à + 4°C.

Solution diluée d'hydroxyproline :

cette solution doit être préparée au moment de l'emploi. 1 ml de solution stock est dilué dans 100 ml de solution de Na OH 1,0 N. 1 ml de cette solution diluée contient 10 μg d'hydroxyproline.

La dilution est effectuée avec une solution de Na OH 1,0 N afin que la gamme colorée soit préparée dans les mêmes conditions que les échantillons inconnus, qui, nous le verrons plus loin, sont obtenus en solution dans Na OH 1,0 N, après purification préalable.

Solution de sulfate de cuivre :

solution aqueuse 0,05 M de SO_4 Cu (Prolabo R.P. pour analyses), soit 1,248 g pour 100 ml.

Solution d'eau oxygénée :

10 ml de perhydrol Merck sont dilués extemporanément avec 20 ml d'eau distillée, ce qui correspond à une solution à "10 volumes".

Solution d'acide sulfurique :

$SO_4 H_2$ 12 N.

Solution de para diméthylamino-benzaldéhyde

(p. D A B)

nous utilisons le para diméthylamino-benzaldéhyde Prolabo pur, après purification par recristallisation (22).

100 g de para diméthylamino-benzaldéhyde sont dissous dans 200 ml d'alcool éthylique pur pour analyses, par agitation et chauffage à 70°C. On ajoute quelques grammes de charbon végétal Norit (Prolabo, R.P.) et on agite vigoureusement. On filtre sur Buchner. Le filtrat incolore est recueilli. On lui ajoute environ trois volumes d'eau distillée froide. Un volumineux précipité blanc apparaît. On recueille le précipité sur Buchner, en lavant à l'eau distillée froide. On essore, on sèche le précipité à l'étuve à 38°C.

Les solutions de cette substance dans l'alcool propylique normal

doivent être incolores, sinon il faut recommencer la cristallisation, jusqu'à l'obtention de solutions parfaitement incolores.

Avec ce para diméthylamino-benzaldéhyde purifié est préparée une solution à 5 g pour 100 ml d'alcool propylique normal (Prolabo R.P.).

b) Dosage :

La prise d'essai est, dans tous les cas, de 2 ml de solution d'hydroxyproline dans la soude en solution 1,0 N. Pour chaque dosage, on prépare en même temps une gamme colorée et les échantillons à doser.

L'intervalle de concentration de l'hydroxyproline pour lequel la coloration développée répond à la loi de BEER-LAMBERT se situe entre 0 et 20 µg dans les conditions de ce dosage. La gamme colorée comporte donc les concentrations 0, 5, 10 et 15 µg d'hydroxyproline témoin, soit 0 - 0,5 - 1 - et 1,5 ml de solution diluée. On complète le volume contenu dans chaque tube à 2 ml avec une solution de Na OH 1,0 N. Chaque standard est fait en double exemplaire.

Le dosage de la solution inconnue est pratiqué sur 2 ml. Les conditions de séparation de l'hydroxyproline avant le dosage proprement dit sont telles que celle-ci soit toujours en solution dans Na OH 1,0 N. Les solutions inconnues sont mesurées en double ou en triple exemplaire.

On ajoute à chaque tube 0,2 ml de solution de SO_4 Cu 0,05 M et 0,2 ml de solution de H_2O_2 à "10 volumes".

On agite les tubes pendant 5 minutes à la température du laboratoire, puis on les place dans un bain-marie à la température de 70°C, pendant 10 minutes. Pendant les 5 dernières minutes, on agite vigoureusement les tubes, 30 secondes par tube, afin de chasser l'excès d'eau oxygénée.

On refroidit au bain de glace avant d'ajouter 0,6 ml de solution de $SO_4 H_2$ 12 N et 2,5 ml de solution de para diméthylamino-benzaldéhyde à 5 g pour 100 ml. On agite vigoureusement les tubes jusqu'à ce que leur contenu soit totalement homogène.

On les place alors au bain-marie à 70°C où on les laisse pendant

40 minutes. La coloration se développe rapidement d'abord puis plus lentement. On refroidit les tubes au bain de glace et on mesure la densité optique à 560 m , soit au spectrophotomètre Coleman Junior, en tubes calibrés de 7,5 mm de diamètre, soit au spectrophotomètre Beckmann DU, en cuves de 10 mm de voie optique.

Dans certains cas, malgré le fractionnement préliminaire, il existe, dans les échantillons provenant de l'urine, une coloration parasite, dont l'absorption maximale se situe dans le jaune. Nous utilisons alors la correction par double spectrophotométrie à 500 et 560 mμ décrite par HUTTERER et SINGER.

La densité optique corrigée X est alors donnée par la relation suivante :

$$X = D_{560} - \left[\frac{D_{500} - (D_{560} \times R)}{Q - R} \right]$$

D = densité optique de l'échantillon inconnu

$R = \frac{A_{500}}{A_{560}}$ pour l'hydroxyproline témoin

$Q = \frac{A_{560}}{A_{500}}$ pour l'hydroxyproline témoin

c) Résultats :

La courbe réalisée avec les standards décrits plus haut est parfaitement linéaire et très stable, à condition que le para diméthylaminobenzaldéhyde soit de bonne qualité (fig. 1)

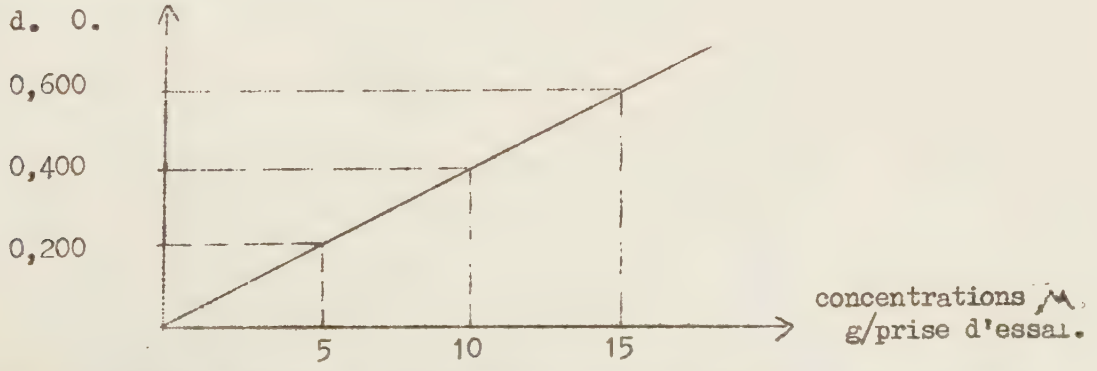


FIGURE 1 : Courbe obtenue avec le spectrophotométre Beckmann D.U. cuves de 10 mm.

Si le para diméthylamino-benzaldéhyde est bien purifié, les coefficients Q et R doivent avoir des valeurs constantes pour toutes les concentrations. Ces valeurs sont par exemple :

$$Q = 3,3 \qquad \text{et} \qquad R = 0,3$$

d) Causes d'erreurs et composés interférents :

Nous avons étudié les interférences éventuelles produites par les causes suivantes :

- variations de pH
- variations de la teneur en sels minéraux
- présence d'acides aminés
- présence d'osamines ou de leurs dérivés N-acétylés.

Le pH des solutions doit être très étroitement fixé à chacun des stades du dosage. Nous avons vu, dans la première partie, que tous les auteurs utilisent pour l'oxydation de l'hydroxyproline par SO_4Cu et H_2O_2 une solution environ 0,6 N de NaOH. Pour le stade de réaction colorée, le pH doit être au contraire environ 1,0 N en SO_4H_2 libre. Les proportions de NaOH et de SO_4H_2 que nous avons choisies répondent à ces nécessités.

Les sels minéraux : nous avons étudié l'influence de sels de sodium et de potassium sur le dosage, en ajoutant des quantités contrôlées de solutions de ClNa et ClK à une solution témoin d'hydroxyproline. Les résultats sont indiqués sur les tableaux 5 et 6.

TAUX DE ClNa	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 mμ	560 mμ	d.O. corrigée
0	0,085	0,185	0,185
4 mg	0,085	0,185	0,185
8 mg	0,085	0,185	0,185
12 mg	0,085	0,185	0,185
16 mg	0,085	0,185	0,185
20 mg	0,085	0,185	0,185

TABLEAU 5 : 5 μg d'hydroxyproline par échantillon, + quantités croissantes de ClNa.

TAUX DE ClK	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 mμ	500 mμ	d.O. corrigée
0	0,085	0,185	0,185
4 mg	0,085	0,185	0,185
8 mg	0,085	0,185	0,185
12 mg	0,085	0,185	0,185
16 mg	0,085	0,185	0,185
20 mg	0,085	0,185	0,185

TABLEAU 6 : 5 μg d'hydroxyproline par échantillon, + quantités croissantes de ClK.

Par conséquent, nous ne trouvons pas d'interférence par ces solutions de sels minéraux. BLOMFIELD et FARRAR (4), WOESSNER (77) ont montré qu'il existe une certaine interférence pour des concentrations élevées de ces sels minéraux. Notre technique nous permet de l'éviter. De toutes façons, les concentrations de sels minéraux de l'urine ne sont jamais suffisantes pour provoquer une telle interférence.

Interférence produite par les acides aminés :

Comme l'ont indiqué un certain nombre d'auteurs (77, 62) plusieurs acides aminés peuvent interférer avec la réaction colorée de l'hydroxyproline. Nous avons passé en revue les principaux types d'acides aminés. Pour cela, nous avons effectué la réaction colorée sur 5 μ g d'hydroxyproline témoin, en présence de quantités croissantes des acides aminés suivants : glycocolle, alanine, sérine, cystéine, phénylalanine, tyrosine, proline, tryptophane. Les tableaux suivants (7 à 14) indiquent les densités optiques obtenues dans nos conditions standard habituelles d'expérience, aux longueurs d'ondes 500 et 560 mμ, avec correction effectuée selon la méthode de HUTTERER et SINGER.

TAUX DE GLYCOCOLLE DE L'ECHANTILLON	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 mμ	560 mμ	d.O. corrigée
0 μg	0,060	0,200	0,200
100 μg	0,050	0,185	0,185
300 μg	0,055	0,185	0,185
600 μg	0,050	0,185	0,185

TABLEAU 7 : 5 μ g d'hydroxyproline par échantillon + quantités croissantes de glycocolle (Serlabo pur. p. analyses)

TAUX D'ALANINE DE L'ECHANTILLON	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 mμ	560 mμ	d.O corrigée
0 μ g	0,060	0,210	0,210
100 μg	0,055	0,200	0,200
300 μg	0,050	0,195	0,195
600 μg	0,050	0,215	0,215

TABLEAU 8 : 5 μ g d'hydroxyproline par échantillon + quantités croissantes d'alanine (B.L.B. pur. p. analyses)

TAUX DE SERINE DE L'ECHANTILLON	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 mμ	560 mμ	d.O. corrigée
0 μg	0,095	0,200	0,200
100 μg	0,095	0,200	0,200
200 μg	0,090	0,195	0,195
400 μg	0,090	0,195	0,195

TABLEAU 9 : 5 μ g d'hydroxyproline par échantillon + quantités croissantes de sérine (Prolabo pur. p. analyses)

TAUX DE CYSTEINE DE L'ECHANTILLON	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 mμ	560 mμ	d.O. corrigée
0 μg	0,085	0,185	0,185
100 μg	0,060	0,160	0,155
300 μg	0,025	0,105	0,105
600 μg	0,015	0,080	0,080

TABLEAU 10 : 5 μg d'hydroxyproline par échantillon + quantités croissantes de cystéine (Serlabo pur. p. analyses)

TAUX DE PHENYLALANINE DE L'ECHANTILLON	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 mμ	560 mμ	d.O. corrigée
0 μg	0,070	0,180	0,175
10 μg	0,100	0,185	0,170
20 μg	0,100	0,185	0,170
40 μg	0,100	0,185	0,170
60 μg	0,090	0,170	0,155
100 μg	0,080	0,160	0,155
200 μg	0,080	0,160	0,155
400 μg	0,080	0,160	0,155
1 000 μg	0,080	0,160	0,155

TABLEAU 11 : 5 μg d'hydroxyproline par échantillon + des quantités croissantes de phénylalanine (Serlabo pur. p. analyses).

TAUX DE TYROSINE DE L'ECHANTILLON	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 m µ	560 m µ	d.O. corrigée
0 µg	0,070	0,200	0,200
10 µg	0,085	0,200	0,190
20 µg	0,095	0,205	0,195
40 µg	0,110	0,215	0,200
60 µg	0,125	0,220	0,200
100 µg	0,145	0,225	0,200
200 µg	0,225	0,250	0,200
400 µg	0,340	0,300	0,270
1 000 µg	0,660	0,390	0,210

TABLEAU 12 : 5 µ g d'hydroxyproline par échantillon + des quantités croissantes de tyrosine (Serlabo pur. p. analyses)

TAUX DE PROLINE DE L'ECHANTILLON	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 m µ	560 m µ	d.O. corrigée
0 µg	0,090	0,200	0,200
100 µg	0,105	0,210	0,210
200 µg	0,105	0,230	0,230
400 µg	0,115	0,210	0,205

TABLEAU 13 : 5 µ g d'hydroxyproline par échantillon + des quantités croissantes de proline (Serlabo pur. p. analyses)

TAUX DE TRYPTOPHANE DES ECHANTILLONS	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 m µ	560 m µ	d.O. corrigée
0 µ g	0,100	0,200	0,200
10 µ g	0,130	0,200	0,180
20 µ g	0,175	0,220	0,180
30 µ g	0,180	0,210	0,165
50 µ g	0,230	0,220	0,140
70 µ g	0,270	0,225	0,125
100 µ g	0,350	0,230	0,080
200 µ g	0,590	0,265	0
400 µ g	0,930	0,360	0

TABLEAU 14 : 5 µ g d'hydroxyproline par échantillon + des quantités croissantes de tryptophane (Serlabo pur. p. analyses)

Les tableaux précédents montrent que la plupart des acides aminés modifient légèrement les résultats de la colorimétrie. Lorsqu'on applique la correction par lecture des densités optiques à deux longueurs d'onde, on constate que presque tous les acides aminés diminuent la densité optique corrigée, donc le rendement de la réaction colorée. Toutefois, cet effet n'apparaît que pour des quantités de l'ordre de 100 à 200 µ g d'acide aminé par prise d'essai, selon les cas. Ces quantités correspondent donc à des solutions d'acides aminés de 50 à 100 mg par litre : seuls, le glycocolle et l'histidine existent, dans l'urine, à des concentrations aussi élevées. L'interférence produite par les acides aminés sera donc minime et très variable selon les fractions d'hydroxyproline urinaire. Nous la discuterons à nouveau dans le cadre du dosage de chaque fraction.

Deux acides aminés se distinguent des autres par l'intensité de la coloration parasite qu'ils provoquent dans les conditions du dosage de l'hydroxyproline : la tyrosine et surtout le tryptophane.

L'interférence par la tyrosine est classique. Elle a été notée en particulier par MARTIN (44). Nous avons constaté qu'elle était assez variable

selon la nature des échantillons de tyrosine utilisés. Par exemple un échantillon ancien de tyrosine R.P. nous a donné une interférence plus marquée. Cette interférence résulte d'une forte élévation de la densité optique à 500 mμ qui se répercute à la longueur d'onde 560 mμ pour les fortes concentrations (tableau 15).

TAUX DE TYROSINE DE L'ECHANTILLON	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)	
	500 mμ	560 mμ
10 μg	0,015	0,005
20 μg	0,020	0,015
40 μg	0,040	0,030
60 μg	0,055	0,035
100 μg	0,090	0,055
200 μg	0,155	0,100
400 μg	0,240	0,125
1 000 μg	0,560	0,305

TABLEAU 15 : Réaction de la tyrosine avec le para diméthylamino-benzaldéhyde (sans hydroxyproline)

Nous avons également étudié le spectre d'absorption des produits colorés obtenus avec l'hydroxyproline, la tyrosine et le mélange des deux (figure 2).

Le spectre donné par le mélange est assez mal défini. Remarquons le spectre particulier de la tyrosine après réaction avec le para diméthylamino-benzaldéhyde : il existe un petit pic d'absorption dont le maximum se situe à 680 mμ. On pourrait tirer parti de ce fait pour évaluer la quantité de tyrosine présente. En fait, il y a peu de tyrosine dans l'urine normale : elle ne risque guère d'interférer.

L'interférence provoquée par le tryptophane est beaucoup plus grave car elle est double. Il y a d'une part formation d'une substance colorée jaune dont le spectre déborde rapidement sur la longueur d'onde du dosage de l'hy-

droxyproline, et, d'autre part, une forte inhibition de la réaction de l'hydroxyproline elle-même. Le tableau 14 indiquait bien ces deux faits, puisque la coloration est intense à la longueur d'onde 500 m μ , beaucoup plus faible à la longueur d'onde 560 m μ . la correction de HUTTERER et SINGER est inutile.

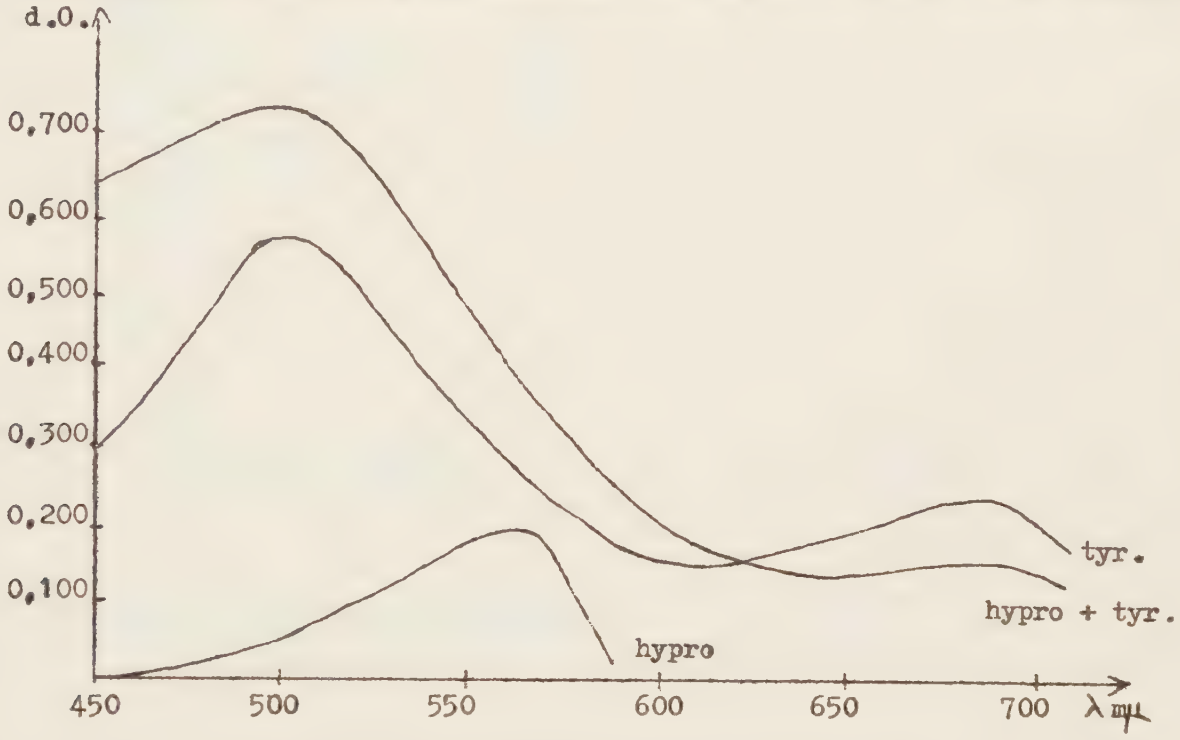


Figure 2 : Spectre d'absorption hypro, tyr et hypro + tyr.

La coloration obtenue en soumettant une solution de tryptophane à la réaction est intense, et le spectre d'absorption du produit coloré présente un maximum à la longueur d'onde 470 m μ (figure 3). Ce spectre est différent de celui que donne la tyrosine dans les mêmes conditions.

Par conséquent, de tous les acides aminés, c'est essentiellement le tryptophane qui est le plus génant dans ce dosage. Il s'agira donc d'en débarasser les solutions à doser, ou de se placer dans des conditions de dilution telles que son interférence soit minime. A côté du tryptophane, les dérivés indoliques, porteurs d'un groupement pyrrole avec la position α libre (ce pyrrole fait partie du noyau indolique mais possède la même réactivité que le pyrrole libre) interfèrent également avec la réaction.

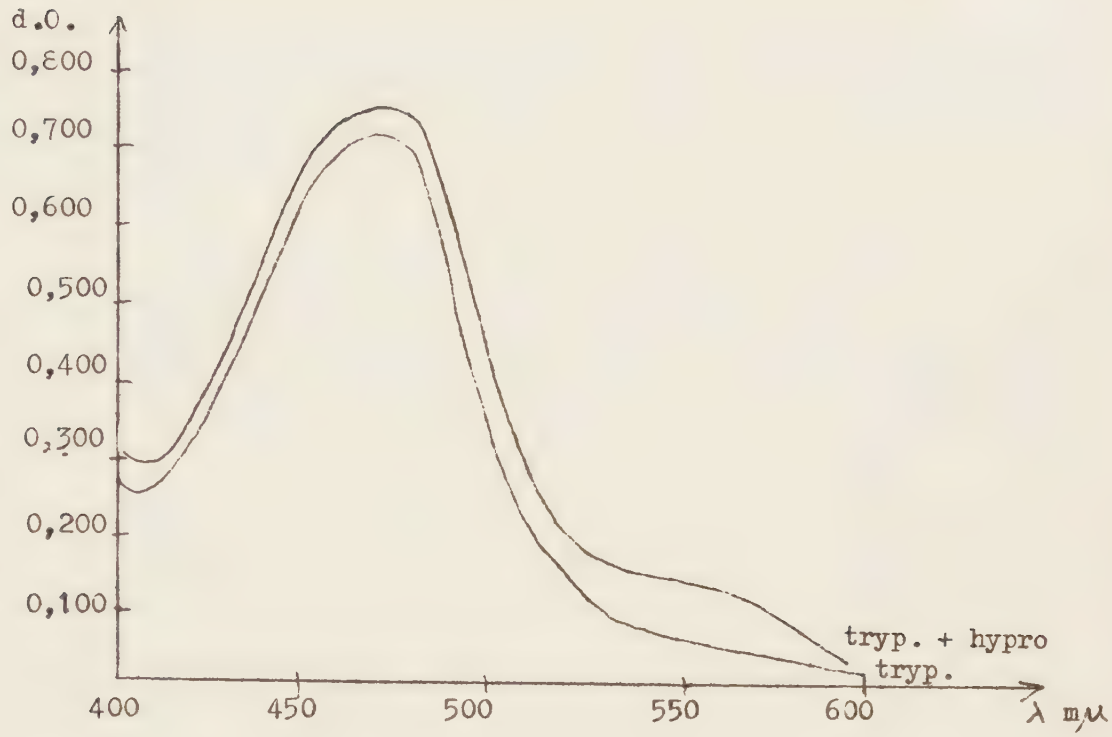


Figure 3 : Spectre d'absorption du produit coloré donné par réaction du tryptophane avec le para diméthylamino-benzaldéhyde.

Interférence causée par les osamines :

Les N-acétyl osamines réagissent avec le para diméthylamino-benzaldéhyde : on sait qu'il s'agit là d'une de leurs méthodes de dosage (51). Les osamines libres ne réagissent pas dans les mêmes conditions, comme nous l'avons vérifié (TABLEAU 16).

TAUX DE GLUCOSAMINE DE L'ECHANTILLON	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 mμ	560 mμ	d.O. corrigée
0	0,090	0,200	0,200
100 μg	0,090	0,200	0,200
200 μg	0,090	0,200	0,200
400 μg	0,090	0,200	0,200

TABLEAU 16 : 5 μg d'hydroxyproline par échantillon + taux croissants de glucosamine.

Par contre, la N-acétyl-glucosamine préparée par réaction avec l'acétyl-acétone selon la méthode de NEUHAUS, donne, dans les conditions du dosage de l'hydroxyproline, une coloration importante à la longueur d'onde 560 m μ (TABLEAU 17).

TAUX D'ACETYL GLUCOSAMINE PAR ECHANT.	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 m μ	560 m μ	d.O. corrigée
8 μg	0,015	0,040	0,040
16 μg	0,065	0,080	0,065
32 μg	0,175	0,175	0,135

TABLEAU 17 : coloration obtenue avec la N-acétyl-glucosamine (sans hydroxyproline).

Quand N-acétyl-glucosamine et hydroxyproline sont dosées ensembles, leurs colorations sont sensiblement additives, comme l'indique le TABLEAU 18 suivant.

TAUX D'ACETYL GLUCOSAMINE PAR ECHANT.	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 m μ	560 m μ	d.O. corrigée
0 μg	0,090	0,200	0,200
8 μg	0,105	0,210	0,210
16 μg	0,145	0,280	0,275
32 μg	0,295	0,350	0,290

TABLEAU 18 : 5 μ g d'hydroxyproline par échantillon + des concentrations croissantes de N-acétyl-glucosamine.

Tout le problème revient donc à éliminer les acétyl-osamines des solutions à doser.

Un autre type d'osamine peut encore interférer, c'est l'acide N-

acétyl-neuraminique. Nous avons vérifié qu'il donnait une coloration rose avec le para diméthylamino-benzaldéhyde dans les conditions du dosage de l'hydroxyproline (TABLEAU 19).

TAUX D'ACIDE N - ACETYL NEURAMINIQUE	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 mμ	560 mμ	d.O. corrigée
20 μg	0,040	0,050	0,050
40 μg	0,060	0,080	0,080
60 μg	0,075	0,100	0,100
100 μg	0,095	0,135	0,135
200 μg	0,100	0,215	0,205
300 μg	0,215	0,265	0,250

TABLEAU 19 : Réaction de l'acide-N-acétyl-neuraminique (produit Sigma) avec le para diméthylamino-benzaldéhyde (sans hydroxyproline).

L'interférence est parfaite puisque la coloration obtenue est strictement identique à celle que donne l'hydroxyproline. En outre, comme le montre le TABLEAU suivant, il n'y a pas additivité entre les deux colorations lorsqu'on effectue la réaction sur le mélange d'hydroxyproline et d'acide N-acétyl-neuraminique.

TAUX D'ACIDE N - ACETYL NEURAMINIQUE PAR ECHANT.	Densités optiques (spectrophotomètre Beckmann DU, cuves 10 mm)		
	500 mμ	560 mμ	d.O. corrigée
0 μg	0,120	0,160	0,160
20 μg	0,145	0,200	0,195
40 μg	0,160	0,200	0,185
60 μg	0,180	0,230	0,205
100 μg	0,200	0,260	0,245
200 μg	0,260	0,330	0,310
300 μg	0,325	0,400	0,365

TABLEAU 20 : 5 μg d'hydroxyproline par échantillon + des quantités croissantes d'acide N-acétyl-neuraminique.

Comme nous l'avons dit à propos des N-acétyl-osamines, il faut donc séparer au préalable l'acide N-acétyl-neuraminique de l'hydroxyproline avant de doser celle-ci.

2 - Dosage de l'hydroxyproline totale :

Le volume de l'urine des 24 heures est noté. Si le dosage n'est pas réalisé immédiatement, l'urine est stockée à -20°C, après addition de quelques gouttes de toluène. Avant le dosage, l'urine est filtrée. Ne pas conserver l'urine sur thymol car celui-ci pourrait interférer avec la colorimétrie.

Le dosage est précédé d'une hydrolyse destinée à libérer l'hydroxyproline peptidique. La réaction avec le para diméthylamino-benzaldéhyde n'est pas donnée par l'hydroxyproline peptidique.

a) Conditions d'hydrolyse :

Nous utilisons pour l'hydrolyse l'acide chlorhydrique en solution 6 N, qui nous paraît le plus efficace. L'acide chlorhydrique Prolabo R.P. pour analyses, sans redistillation préalable ne contient pas de substances réagissante avec le para diméthyl-amino benzaldéhyde.

On introduit dans des ampoules de contenance 4 ml, le mélange à volumes égaux d'urine filtrée et d'acide chlorhydrique concentré. Les ampoules sont scellées à la flamme. Elles sont introduites dans une étuve à température constante.

Nous avons pratiqué des essais à plusieurs températures et pendant des durées différentes. Il serait intéressant d'abréger autant que possible la durée de l'hydrolyse, dont dépend la durée totale du dosage. D'autre part comme on l'a vu plus haut, l'accord est loin d'être fait sur la durée de l'hydrolyse nécessaire.

Nous avons constaté comme d'autres auteurs, que l'hydrolyse était totale à 100°C au bout de 24 heures. Par contre l'hydrolyse à 120°C pendant 6 heures nous a paru insuffisante. En définitive, nous avons adopté une durée d'hydrolyse de 12 heures à 110°C, ce qui permet de commencer l'hydrolyse le soir et de pratiquer le dosage le lendemain. Nous avons vérifié que l'hydro-

xyproline libre résistait dans tous les cas à l'hydrolyse même prolongée.

b) Préparation des hydrolysats en vue du dosage : 2 ml du mélange hydrolysé prélevés dans les ampoules sont transférés dans un tube à essais et évaporés à la trompe à vide jusqu'à siccité. Le résidu brunâtre est repris par un volume de solution de Na OH 1,0 N aussi faible que possible, auquel on ajoute quelques milligrammes de charbon végétal Norit (Prolabo R.P.). On agite afin de fixer les pigments brunâtres formés au cours de l'hydrolyse de l'urine et on filtre sur un très petit filtre, en étalant le charbon. On lave ensuite le charbon et le filtre avec de la solution de Na OH 1,0 N. L'ensemble des solutions de lavage est recueilli dans une fiole jaugée de 10 ml et complété à ce volume avec de la solution de Na OH 1,0 N.

Le charbon suffit en général à fixer l'essentiel des substances brunes interférentes, mais il risque de fixer également de l'hydroxyproline. Il faut donc être très prudent dans son emploi. Nous avons vérifié la proportion d'hydroxyproline retenue sur ce charbon dans nos conditions expérimentales en mesurant la récupération de solutions témoin d'hydroxyproline traitée dans les mêmes conditions. La récupération de l'hydroxyproline est de l'ordre de 98 pour cent. Par conséquent le charbon est utilisable pour chasser les pigments interférant avec la colorimétrie.

c) Dosage :

Le dosage colorimétrique est alors pratiqué sur 2 ml de solution clarifiée sur charbon, en double ou triple exemplaire.

Chaque échantillon correspond à 2/10 de la quantité d'hydroxyproline présente dans 2 ml d'hydrolysat, c'est-à-dire dans 1 ml d'urine initiale. Le taux par échantillon, multiplié par 5, donne le taux d'hydroxyproline par ml d'urine. Comme les taux normaux d'hydroxyproline totale s'échelonnent entre 20 et 40 mg par 24 heures, soit en moyenne 30 mg/litre, 30 μ g par ml, la concentration de 6 μ g par échantillon confère au dosage un maximum de sensibilité.

d) Composés interférents :

Le dosage est pratiqué sur une solution diluée 5 fois par rapport

à l'urine. C'est dire que les taux d'acides aminés urinaires risquent peu d'interférer. En outre, la tyrosine et la phénylalanine sont fixées sur le charbon actif, ainsi qu'une bonne partie des composés indoliques éventuellement présents. L'expérience prouve que les colorations finales sont 9 fois sur 10 excellentes, et que la correction de HUTTERER et SINGER apporte une précision suffisante. Nous avons vérifié ce fait en surchargeant des urines avec une quantité connue d'hydroxyproline : la surcharge est intégralement retrouvée par différence.

Dans quelques rares cas, toutefois, nous avons obtenu des résultats douteux, parce que la densité optique du produit de réaction était aussi forte à 500 m μ qu'à 560 m μ. Ce sont des cas où le taux d'hydroxyproline urinaire est bas, alors que le volume de la diurèse est réduit.

Par ailleurs, les acétyl-osamines sont désacétylées au cours de l'hydrolyse, tandis que l'acide sialique est détruit : ces composés ne peuvent donc pas interférer avec le dosage de l'hydroxyproline totale.

L'urobilinogène réagit avec le para diméthylamino-benzaldéhyde en solution acide, tandis que l'urobiline ne réagit pas. Par conséquent, le stade d'oxydation préalable suffit à lever l'éventuelle interférence de l'urobilinogène, dont nous ne savons pas, du reste, s'il résiste à l'hydrolyse chlorhydrique.

Un certain nombre de composés interférents peuvent se trouver accidentellement dans l'urine, en particulier après ingestion de divers médicaments. Il s'agira par exemple de phloroglucinol, pyrogallol, résorcinol, orcinol, qui réagissent avec le para diméthylamino-benzaldéhyde (18). Nous n'avons pas constaté de telles interférences dans la série de nos cas personnels.

e) Résultats normaux :

Nous estimons que notre méthode de dosage de l'hydroxyproline totale nous place pratiquement dans les conditions utilisées par KLEIN 35) RAVENNI (64) et différents auteurs, qui ont admis comme valeurs normales de l'hydroxyproline urinaire des chiffres de 20 à 40 mg par 24 heures. Par ail-

leurs, les valeurs normales données par les auteurs qui utilisent d'autres techniques, par exemple celle de PROCKOP et UDENFRIEND, ne sont pas très différentes. Certains ont constaté que des adultes normaux pouvaient avoir des taux un peu plus élevés, avec un maximum de l'ordre de 45 mg. Nous-mêmes, sur une courte série de cas d'adultes normaux, avons obtenu des résultats qui se placent tous dans cet intervalle 20 - 40 mg, avec une exception pour un sujet en bonne santé dont l'hydroxyprolinurie totale s'élevait à 45 mg par 24 heures. Nous admettons donc que nos taux normaux d'hydroxyproline totale, chez l'adulte, se situent entre 20 et 40 mg, l'élévation n'étant certaine qu'au dessus de 50 mg par 24 heures.

Il faut remarquer la difficulté constante que représente la collection des urines de 24 h., en particulier chez les sujets non hospitalisés. Toute perte d'urine équivaut à une erreur par défaut. Certains ont proposé de doser la créatinine afin d'apprécier les pertes éventuelles, mais cette méthode est aléatoire, en particulier en cas d'insuffisance rénale.

Chez l'enfant, les valeurs de l'hydroxyprolinurie sont beaucoup plus élevées. Notre série de témoins normaux ne permet pas d'envisager tous les âges. Des valeurs beaucoup plus fortes que chez l'adulte sont normales. Nous n'avons pas rencontré de taux supérieur à 100 mg par 24 h. L'interprétation des résultats, dans les cas pathologiques, est beaucoup plus difficile que chez l'adulte.

3 - Dosage de l'hydroxyproline libre :

a) Protocole :

L'hydroxyproline est fixée sur résine Dowex 1 échangeuse d'anions, préalablement transférée dans le cycle OH^- . Les cations minéraux et la majorité des substances chromogènes de l'urine passent dans l'effluent. L'hydroxyproline est ensuite éluée par une solution de Na OH 1,0 N, accompagnée par les acides aminés, tandis que les pigments urinaires, qui interféreraient avec le dosage, restent sur la colonne.

L'emploi d'une solution de Na OH 1,0 N comme éluant permet de pratiquer directement la colorimétrie sur l'éluat.

La résine utilisée est la Dowex 1-x-8, 50 à 80 meshes. Elle est préparée par plusieurs passages successifs dans les cycles OH^- et Cl^-, puis elle est disposée dans des colonnes de diamètre intérieur 12 mm, dans lesquelles la hauteur de la résine est de l'ordre de 12 cm.

Avant l'emploi, la résine est mise en forme OH^- par le passage de 50 ml de NaOH en solution 2 N, puis lavée jusqu'à ce que l'effluent soit neutre.

On fait alors passer lentement sur cette colonne 20 ml d'urine filtrée. On lave avec de l'eau distillée jusqu'à ce que l'effluent soit neutre. Il faut en moyenne 100 ml d'eau distillée. Ces effluents, ne contiennent pas d'hydroxyproline libre.

On élue ensuite l'hydroxyproline par une solution de NaOH 1,0 N. On recueille 60 ml d'éluat à partir du moment où il commence à s'écouler alcalin.

On pratique directement le dosage de l'hydroxyproline par la méthode décrite plus haut, sur des échantillons de 2 ml de cet éluat.

Le taux de l'hydroxyproline libre est donné par la relation :

concentration d'hydroxyproline libre en mg par 24 heures

$$= \frac{\left(\begin{array}{l}\text{conc. dans 2 ml}\\ \text{d'éluat en } \mu g\end{array}\right) \times 30 \times \left(\begin{array}{l}\text{volume urinaire des}\\ \text{24 heures en ml}\end{array}\right)}{20 \times 1\,000}$$

Régénération des colonnes : après passage de l'urine, les colonnes sont régénérées par lavage avec une solution d'acide acétique à 50 pour 100 (v./v.). Cette solution entraîne les pigments urinaires. L'effluent est fortement coloré en jaune. Il faut poursuivre le lavage jusqu'à ce que cet effluent s'écoule incolore. Notons que ce lavage très acide bouleverse le contenu de la colonne, provoquant un dégagement de CO_2 à partir des bicarbonates. Il est nécessaire, après ce passage de laver abondamment à l'eau la résine et de chasser les bulles d'air à l'aide d'une baguette de verre. Ensuite on fait passer 50 ml de NaOH en solution 2 N, et la colonne est à nouveau prête à fonctionner.

Un pigment urinaire, fortement fixé à la colonne, est très peu élué au cours de la régénération. Les colonnes finissent par être colorées en brun foncé. Il faut donc en changer au bout d'un certain nombre de passages (de l'ordre d'une centaine).

b) Vérification expérimentale :

Cette vérification a consisté à surcharger des urines normales avec de l'hydroxyproline témoin en quantité exactement connue, et à appliquer le protocole de dosage de l'hydroxyproline libre à ces urines surchargées.

Notons d'abord qu'on ne trouve pas la moindre trace d'hydroxyproline quand on applique directement le dosage de HUTTERER et SINGER à l'urine surchargée, même avec des quantités appréciables d'hydroxyproline. Il est probable que d'autres composés réducteurs urinaires interférent avec l'oxydation en pyrrole, tandis que certaines substances urinaires sont en compétition avec ce pyrrole pour réagir avec le para diméthylamino-benzaldéhyde.

Par contre, le dosage des éluats de résine Dowex 1 par la méthode décrite ci-dessus, permet des récupérations quantitatives.

Nous avons d'abord opéré sur des solutions d'hydroxyproline témoin. Nous avons fixé 100 μ g d'hydroxyproline sur une colonne de Dowex et élué par une solution de NaOH 1,0 N. Nous avons recueilli des fractions d'éluat de 10 ml chacune et avons dosé la concentration en hydroxyproline de chaque fraction. Le TABLEAU 21 indique les résultats.

On voit que la récupération est excellente. Il faut pour cela que l'élution soit lente. Il est important de ne pas trop diluer l'hydroxyproline afin que le dosage ait une sensibilité suffisante. Si l'on veut obtenir une sensibilité de l'ordre de 1 μ g d'hydroxyproline par ml d'urine, la prise d'essai étant de 20 ml d'urine, c'est environ 10 μ g d'hydroxyproline qui devront être évalués dans l'éluat. La sensibilité de la réaction colorée permet d'évaluer environ 0,75 μ g par tube au minimum (soit une densité optique de 0,030 à 560 m μ). Cela représente 0,35 μ g par ml d'éluat (le dosage est effectué sur 2 ml d'éluat). Le volume idéal d'éluat à utiliser serait donc de $\frac{20}{0,35}$ = 57 ml. Effectivement, nous constatons que 93,5 pour 100 de l'hydro-

xyproline sont entraînés par 60 ml de solution de NaOH 1,0 N. Nous préférons ne pas obtenir une récupération totale de l'hydroxyproline tout en étant sûrs de la précision du dosage. Pour cette raison nous élûons toujours par 60 ml de solution de NaOH 1,0 N.

N° FRACTION (10 ml par fraction)	CONCENTRATION µg par ml	CONCENTRATION TOTALE DE LA FRACTION.
1	0,2 µg	1 µg
2	2 µg	10 µg
3	5 µg	25 µg
4	5,5 µg	27,5 µg
5	3,7 µg	18,5 µg
6	2,3 µg	11,5 µg
7	0,6 µg	3 µg
8	0,2 µg	1 µg
9	0,2 µg	1 µg
10	0 µg	0 µg
TOTAL	.....	....98,5 µg

TABLEAU 21 : Elution fractionnée de 100 µ g d'hydroxyproline sur colonne de résine Dowex 1.

Remarquons que ce volume dépend du volume de résine Dowex 1 employé. Il est plus important pour des colonnes plus hautes. On n'a pas intérêt à trop diminuer la quantité de résine, car on risque de ne pouvoir fixer la totalité des anions urinaires et de perdre ainsi de l'hydroxyproline.

Il est indispensable, lorsqu'on prépare une telle colonne, de vérifier, à l'aide d'une solution témoin d'hydroxyproline, quel volume d'éluat est nécessaire pour entraîner l'hydroxyproline fixée.

Par ailleurs, il faut recueillir l'éluat sodique à partir du moment où il s'écoule alcalin : avec les quantités de résine que nous utilisons, les 10 premiers ml d'éluat ne contiennent pas d'hydroxyproline. En pratique

il faut commencer à recueillir l'éluat à partir du moment où son pH dépasse 7, ce qui est facile à vérifier à l'aide de papier indicateur.

N° FRACTION (10 ml par fraction)	CONCENTRATION µg par ml	CONCENTRATION TOTALE DE LA FRACTION
1	2,7 µg	13,5 µg
2	8,5 µg	42,5 µg
3	7,3 µg	36,5 µg
4	3,6 µg	18,0 µg
5	2,3 µg	11,5 µg
6	1,3 µg	6,5 µg
7	0,7 µg	3,5 µg
8	0,7 µg	3,5 µg
TOTAL	.....	.... 135,5 µg

TABLEAU 22 : Elution fractionnée de l'hydroxyproline présente en surcharge dans l'urine.

Nous avons étudié ensuite la récupération à partir d'urines surchargées d'hydroxyproline témoin. Nous avons fixé 20 ml d'urine normale, dont un précédent dosage nous avait montré qu'elle contenait 1,9 mg par litre, soit 1,9 µg par ml : 38 µ g d'hydroxyproline libre dans les 20 ml, auxquels nous avons ajouté 100 g d'hydroxyproline témoin, soit un total de 138 µg. Le TABLEAU 22 donne les valeurs récupérées. On voit que la récupération est de plus de 90 pour 100 en 60 ml et 97 pour 100 en 80 ml d'éluat.

c) Composés interférents :

Les acides aminés urinaires peuvent interférer. Nous savons déjà qu'ils contribuent, dans l'ensemble, à diminuer le taux apparent d'hydroxyproline. Toutefois, le dosage est pratiqué sur une solution diluée au tiers par rapport à l'urine initiale, donc le taux d'acides aminés qu'elle contient est toujours faible.

Il est exceptionnel que la coloration jaune donnée par le tryptophane ou par la tyrosine vienne interférer avec le dosage de l'hydroxyproline libre. Très probablement, la concentration urinaire en tryptophane est trop faible pour interférer, tandis que les aminés indoliques, ne se fixent pas sur la colonne de résine échangeuse d'anions. Dans tous les cas, la correction de HUTTERER et SINGER suffit à éviter l'interférence. Le passage sur résine Dowex 1 a également l'avantage de retenir les pigments urinaires : l'éluat sodique est totalement incolore.

Les acétyl-osamines sont légèrement basiques : elles ne se fixent pas sur Dowex 1 et ne peuvent se trouver dans l'éluat sodique.

L'acide acétyl-neuraminique, quant à lui, dont nous connaissons l'interférence avec la colorimétrie de l'hydroxyproline, se fixe sur Dowex 1 et se trouve probablement dans l'éluat. Nous ne l'avons pas vérifié. Les taux, à l'état libre, dans l'urine, sont faibles, mais il existe des dérivés urinaires, récemment décrits, du type du neuraminlactose (23) dont le taux est de l'ordre de 20 à 50 mg par 24 heures chez l'homme normal, qui pourraient interférer.

d) Comparaison avec d'autres méthodes :

Comme nous l'avons indiqué dans la première partie, nous n'avons pas utilisé la méthode de PROCKOP et UDENFRIEND (62), parce qu'elle nous paraît un peu délicate pour se plier à une application clinique courante.

Nous avons par contre essayé la méthode de CESSI et SERAFINI-CESSI (69). Cette méthode est rapide, à condition de disposer d'un tout petit appareil à distiller adéquat. Elle donne une gamme colorée très reproductible entre 0 et 10 μg d'hydroxyproline.

Appliquée à l'urine, cette méthode nous a toujours donné des résultats plus faibles que notre méthode de fixation sur Dowex 1 (TABLEAU 23). Peut-être la différence est-elle représentée par les taux d'acétylosamines et d'acide acétyl-neuraminique de l'urine ?

Urine	Taux d'hydroxyproline libre	
	Méthode proposée	Méthode de CESSI
1	8 mg	6,5 mg
2	7 mg	5,6 mg
3	21 mg	11,2 mg

TABLEAU 23 : Comparaison entre les méthodes de fixation sur Dowex 1 et de distillation.

Nous avons remarqué que plusieurs substances urinaires pouvaient interférer avec ce mode de dosage de l'hydroxyproline. Nous en citerons une qui n'a pas été mentionnée jusqu'ici, c'est la proline. Il semble que la proline entre en compétition avec la réaction d'oxydation de l'hydroxyproline, ou encore empêche la distillation du pyrrole. Ainsi la technique de CESSI, appliquée aux mélanges de proline et hydroxyproline témoin, nous a donné des résultats inférieurs à ceux que donnent les solutions d'hydroxyproline témoin seule (TABLEAU 24).

Taux d'hydroxyproline	Taux proline	RESULTATS	
		d.O. 560 mμ méthode personnelle	d.O. 560 mμ méthode de CESSI
5 μg	0 μg	0,160	0,120
10 μg	0 μg	0,320	0,240
0 μg	100 μg	0,015	0,000
5 μg	100 μg	0,160	0,095
10 μg	100 μg	0,330	0,180

TABLEAU 24 : Interférence de la proline dans le dosage de l'hydroxyproline par distillation.

Comme on voit, 100 µg de proline n'interfèrent nullement avec notre colorimétrie, tandis que 100 µg de proline provoquent une diminution de densité optique de 25 pour 100 par rapport à l'hydroxyproline témoin mesurée dans les mêmes conditions.

e) Résultats normaux :

Rappelons d'abord que les quelques auteurs qui ont dosé l'hydroxyproline libre chez le sujet normal, lui attribuent des valeurs très faibles (TABLEAU 4), de 0,3 à 2,15 mg par 24 heures. Nos propres résultats concernant d'une part une courte série de sujets normaux (adultes et enfants), d'autre part une importante série de malades chez lesquels l'hydroxyproline libre atteignait un faible pourcentage de l'hydroxyproline totale. Un de nos sujets normaux avait un taux d'hydroxyproline libre de l'ordre de 4 mg. Les autres sujets normaux et beaucoup de malades, même ayant une hydroxyprolinurie totale élevée, avaient des taux de l'ordre de 2 mg. 2 enfants normaux avaient des taux de 2 mg par 24 heures, tandis qu'un troisième avait 3,15 mg par 24 heures. Tout ceci nous conduit à situer nos valeurs normales d'hydroxyproline libre à des taux un peu plus élevés que celui des autres auteurs : jusqu'à 4 mg par 24 heures nous considérons que le taux est normal. Il n'y a élévation qu'à partir de 5 mg par 24 heures.

Pourquoi nos taux sont-ils plus élevés que ceux que donnent les autres méthodes ? Nous pensons d'abord que notre dosage, portant sur 20 ml d'urine est plus sensible que d'autres et se fait avec un meilleur rendement. Les méthodes de dosage direct sur l'urine totale ne peuvent fournir aucun résultat valable. Comme nous l'avons déjà dit, elles ne permettent pas de retrouver l'hydroxyproline témoin ajoutée à l'urine. Les méthodes d'extraction, comme celle de PROCKOP et UDENFRIEND sont beaucoup plus valables, mais leur extraction n'est peut-être pas quantitative ? Il ne nous a pas semblé que ces auteurs aient étudié la récupération quantitative d'hydroxyproline témoin ajoutée à une urine.

Notre méthode, nous en convenons, manque peut-être de spécificité à cause de l'interférence éventuelle par l'acide sialique et ses dérivés urinaires. Nous avons l'intention de vérifier ce point par des expériences com-

plémentaires, en particulier en dosant l'acide sialique présent dans les hydrolysats. Si l'on tient pour valables les quelques données fragmentaires de la littérature sur les taux d'acide sialique libre et combiné de l'urine normale, en admettant que l'interférence provoquée par l'acide combiné est identique à celle que réalise l'acide libre, on peut admettre que ce taux est, au maximum, de 50 mg par litre d'urine. Ceci correspond à 1 000 µ g dans 20 ml ou encore dans 60 ml d'éluat, après passage sur Dowex 1, soit finalement 33 µg par prise d'essai en vue du dosage. Nous avons dit plus haut que l'interférence n'était notable que pour des quantités supérieures à 100 µ g par prise d'essai ; elle reste donc pratiquement négligeable.

B - SEPARATION DES DIVERSES FORMES D'HYDROXYPROLINE PEPTIDIQUE

Nous n'avons pas voulu borner notre étude aux deux formes libre et totale d'hydroxyproline. Il nous a semblé en effet, intéressant d'envisager les variations quantitatives d'élimination de chaque type de peptide urinaire contenant de l'hydroxyproline dans divers syndromes pathologiques. Notre but n'est pas de répéter les expériences qui ont permis depuis longtemps à d'autres auteurs, comme on l'a vu dans la première partie de ce travail, de caractériser la plupart des peptides à hydroxyproline de l'urine. Même si la liste de ces peptides n'était pas encore close, leur étude structurale est, nous semble-t-il, suffisamment avancée pour qu'on puisse maintenant se poser d'autres questions, et en particulier la suivante : peut-on démontrer que certaines formes de peptides à hydroxyproline sont éliminées dans l'urine en plus grandes quantités que d'autres dans des états pathologiques définis, et ceci avec une fréquence suffisante pour qu'on en tire des déductions sémiologiques valables ? Nos expériences ci-dessous relatées constituent un début de réponse.

1 - Séparation des peptides à hydroxyproline :

Technique :

La plupart des auteurs qui ont étudié cette structure ont utilisé le fractionnement sur résine cationique Dowex 50, selon la méthode de MOORE et STEIN. Ce sont des techniques très précises, mais longues et par conséquent inapplicables en Chimie clinique. Pour cette raison, nous n'avons pas cru

devoir les essayer. Par ailleurs, nous avons voulu savoir quel était le comportement des fractions peptidiques à hydroxyproline au cours du fractionnement de l'hydroxyproline libre que nous avons mis au point sur colonne de résine Dowex 1 en phase OH^-. Nous avons constaté que cette méthode aboutissait à un fractionnement valable des peptides à hydroxyproline.

C'est ainsi que nous opérons maintenant une étude simultanée de l'hydroxyproline libre et de ses fractions liées à des peptides. 20 ml d'urine sont fixés sur résine Dowex 1 en phase OH^-. L'effluent non fixé sur la colonne est recueilli, son volume mesuré, une partie aliquote est prélevée, mélangée avec un égal volume de ClH concentré et soumis à une hydrolyse de 12 heures à 110°C. L'hydroxyproline contenue dans cette fraction est dosée colorimétriquement après concentration à sec de l'hydrolysat et reprise du résidu par 2 ml de solution de NaOH 1,0 N. Lorsque l'effluent de la colonne s'écoule neutre, l'élution par une solution de NaOH 1,0 N est commencée, comme dans le cas du dosage de l'hydroxyproline libre. L'éluat est recueilli à partir du moment où il s'écoule alcalin. 60 ml sont ainsi recueillis. On dose directement l'hydroxyproline libre sur 2 fractions de 2 ml chacune, 2 autres fractions sont mélangées chacune avec 3 ml d'acide chlorhydrique concentré (Prolabo, pur. p. analyses). Cette élution par une solution alcaline précédant une hydrolyse acide peut paraître illogique, mais une élution acide entraînerait les pigments urinaires qui interfèrent à coup sûr avec les dosages ultérieurs. Le mélange de 2 ml d'une solution 1,0 N en NaOH avec 3 ml d'acide chlorhydrique concentré donne une solution approximativement 6,8 N en ClH libre, qui permet une hydrolyse chlorhydrique à 110°C pendant 12 heures dans de bonnes conditions. Après hydrolyse, 2 ml de solution chlorhydrique sont concentrés à sec et repris par 2 ml de solution de NaOH N, sur lesquels sont pratiqués les opérations habituelles du dosage.

Expression des résultats :

Nous exprimons le taux de chacune des fractions peptidiques en mg d'hydroxyproline qu'ils contiennent, rapportés à la diurèse des 24 heures. Le taux de peptides à hydroxyproline non fixés sur Dowex 1 est égal au produit du volume d'effluent par la concentration d'hydroxyproline dans l'échantillon dosé (qui correspond à 1 ml de cet effluent). La concentration en pep-

tides fixés sur Dowex est plus difficile à calculer. 2 ml d'éluat ont été dilués à 5 ml par addition de ClH concentré. Le dosage est pratiqué sur 2 ml de cette solution, donc le taux d'hydroxyproline par échantillon correspond aux 2/5èmes de la quantité présente dans 2 ml d'éluat. Comme le volume total d'éluat est 60 ml, il y en a 60 fois plus dans cet éluat, et 20 fois moins dans 1 ml d'urine. Si le volume de la diurèse est V ml, la quantité d'hydroxyproline fixée sur Dowex 1 est donc $\frac{15\ A\ V}{4}$ mais cette valeur comprend aussi l'hydroxyproline libre. Le taux d'hydroxyproline peptidique fixé sur Dowex 1 est donc finalement :

$$\frac{15\ A\ V}{4} - H$$

H, étant le taux d'hydroxyproline libre.
A, étant le taux dans la prise d'essai de 2 ml d'hydrolysat.

Vérification expérimentale :

Nous avons vérifié sur une urine pathologique contenant de grandes quantités d'hydroxyproline totale (sujet atteint de maladie osseuse de Paget) que toute l'hydroxyproline peptidique fixée sur Dowex était bien éluée par 60 ml de solution de NaOH 1,0 N.

L'hydroxyproline totale de ce sujet atteignait 160 mg par 24 heures, son hydroxyproline libre 10,5 mg par 24 heures. Les 60 premiers ml d'éluat sodique, après hydrolyse, contenaient une quantité d'hydroxyproline qui, rapportée aux 24 heures, se montait à 133 mg. Nous avons poursuivi l'élution par 40 ml de solution de NaOH 1,0 N. Ce nouvel éluat a entraîné seulement une quantité d'hydroxyproline correspondant à 3 mg par 24 heures. L'élution est donc achevée avec 60 ml de solution de NaOH. Nous avons essayé de parfaire l'élution avec une solution de NaOH 2,0 N, sans résultat.

Par ailleurs, l'effluent non fixé sur colonne contenait l'équivalent de 12 mg d'hydroxyproline par 24 heures.

Le total de toutes ces fractions représente 148 mg. Il reste 12 mg pour atteindre les 160 mg d'hydroxyproline totale. Nous pensons qu'ils correspondent à un peptide très fortement fixé à la résine Dowex et non élué dans des conditions que nous avons essayées.

Cette vérification nous montre donc que la résine Dowex 1 permet un fractionnement valable des peptides à hydroxyproline de l'urine, l'éluat sodique entraînant en 60 ml tous les peptides qui peuvent être élués.

2 - Nature chimique des deux fractions de peptides à hydroxyproline :

Comme l'ont montré les autres auteurs, les peptides à hydroxyproline sont de petits peptides, pratiquement dialysables en totalité. Au bout de 72 heures de dialyse sous un courant d'eau continuellement renouvelé, il restait dans un de nos cas 4 pour 100 de l'hydroxyproline totale de l'urine initiale dans le boudin de dialyse. Cette quantité est trop faible pour être significative.

La fixation de certains peptides sur résine Dowex 1 en phase OH^- libre signifie naturellement que les peptides fixés ont une polarité acide. Il est possible, en fonction des structures déjà établies de ces peptides, de prévoir lesquels peuvent être retenus, même si leur pH n'est pas connu. La liste des peptides urinaires à hydroxyproline établie par SMILEY et ZIFF (70) et indiquée dans la première partie, est très utile à cet égard. On remarque que 6 peptides sur 13 contiennent des radicaux acides libres en excès. Ce sont des résidus d'acide aspartique, ou, le plus souvent d'acide glutamique en bout de chaîne. Précisément, ces peptides acides ont été trouvées seulement dans l'urine de sujets atteints de polyarthrite chronique évolutive (29). Il est donc intéressant de disposer d'un moyen de les séparer utilisable en Chimie clinique.

Il existe d'autre part un certain nombre de peptides basiques qui ne se fixent pas sur Dowex 1 : ils contiennent de l'arginine ou de la lysine. Ce sont eux qui passent vraisemblablement dans l'effluent.

Enfin, le comportement du dipeptide prolyl-hydroxyproline et du tripeptide glycyl-prolyl-hydroxyproline, qui représentent les 3/4 des peptides à hydroxyproline de l'urine normale en quantité, est plus difficile à affirmer. Une caractérisation de ces peptides avec hydrolyse et détermination de leur contenu en acides aminés peut seule permettre de trancher avec certitude. Il s'agit là d'un travail de longue haleine, que nous avons à peine amorcé.

Nous comptons analyser les peptides préalablement fractionnés sur Dowex 1, dans les cas suivants :

- adulte normal,
- adolescent en voie de croissance,
- malade avant une forte élévation de son hydroxyprolinurie au cours d'une affection osseuse,
- malade ayant une forte hydroxyprolinurie au cours d'un rhumatisme articulaire aigu.

Ainsi seront passés en revue, nous semble-t-il, tous les cas possibles de variations structurale des peptides urinaires à hydroxyproline.

Technique d'isolement :

L'élution de la résine Dowex 1 par solution de NaOH 1,0 N peut être remplacée sans dommage par une solution de KOH 1,0 N. Nous avons vérifié que cette solution entraîne la même quantité d'hydroxyproline fixée sur Dowex 1 que la solution de NaOH. En ajoutant ensuite une solution concentrée d'acide perchlorique, on forme du perchlorate de potassium insoluble, qui précipite. Le filtrat est concentré à très faible volume à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Cette solution permet une chromatographie sur papier, ou une chromato-électrophorèse afin d'isoler les peptides, qui sont caractérisés per les révélations spécifiques par la ninhydrine, l'isatine ou encore la réaction de RYDON et SMITH.

Nous avons utilisé cette technique dans le cas d'une urine de sujet atteint de maladie osseuse de Paget, qui excrétait 160 mg d'hydroxyproline totale par jour. L'élution de la résine Dowex 1 par la solution de KOH 1,0 N entraînait 120 mg d'hydroxyproline. Après précipitation du potassium par l'acide perchlorique et concentration de la solution surnageante, une quantité de solution correspondant à environ 1 mg d'hydroxyproline totale a été déposée sur papier Whatman 3 MM, en bande, et soumise à une électrophorèse à haute tension (appareil Phérograph, Hormuth) 1 h 30 à 1 000 Volts, en tampon pyridine, acide acétique, eau 0,1 M, pH 6,5. Après migration et séchage, des bandes

guide longitudinales ont été découpées et révélées, par l'isatine suivie de para diméthylamino-benzaldéhyde, par la ninhydrine et par le réactif de RYDON et SMITH.

La ligne de déposition est colorée à la fois par tous ces réactifs, montrant que l'hydroxyproline libre et certains peptides ne migrent pas à ce pH. Il existe une zone positive à la ninhydrine à quelques centimètres de la ligne de départ, du côté anodique.

Comme ces réactifs ne sont pas spécifiques des peptides à hydroxyproline, nous avons essayé de localiser plus précisément les peptides à hydroxyproline par hydrolyse : la bande de papier restante est découpée en rectangles de 2 cm de large, ayant la longueur de la ligne de déposition. Chaque rectangle est découpé en petits fragments qui sont plongés dans 5 ml de solution de ClH 6 N. On opère l'extraction par cette solution pendant 2 heures, puis on recommence avec un égal volume de solution. On exprime soigneusement les fragments de papier à l'aide d'une spatule de verre afin de récupérer le maximum de solution. On introduit celle-ci dans des ampoules de verre qu'on scelle. On pratique l'hydrolyse pendant 12 heures à 110°C.

Certes, l'extraction du papier par l'acide chlorhydrique fournit des quantités importantes de chromogène absorbant, après réaction avec le para diméthylamino-benzaldéhyde, dans la région de 500 mμ. Mais la correction de HUTTRER et SINGER permet de localiser facilement la présence de l'hydroxyproline, donc des peptides à hydroxyproline.

La très grande majorité de l'hydroxyproline se trouve dans la zone de la ligne de déposition : 38 μg, une zone peptidique située du côté anodique contient 10 μg, et une zone bleuâtre à la ninhydrine, située vers l'anode contient 4 μg.

Il nous faudra maintenant reprendre cette séparation grossière des peptides à hydroxyproline par électrophorèse à haute tension sur papier Whatman 3 MM, éluer les peptides de chaque fraction et procéder à leur chromatographie sur papier avec le solvant butanol/acide acétique/eau ou avec le solvant de BAGLIONI : alcool isoamylique/pyridine/eau (35/35/20). Ce travail est en cours.

Résultats normaux :

Avant même que nous sachions exactement quelle est la structure de chacun des peptides ainsi isolés, nous pouvons déjà faire état de certaines de leur variations quantitatives, sur une série de cas malheureusement trop courte pour être analysée statistiquement. Nous étudierons ces variations dans la dernière partie, et donnons ici les valeurs obtenues dans une série de 6 sujets normaux. Il s'agit de sujets jeunes, de 20 à 25 ans. Le TABLEAU 25 nous montre la répartition des diverses fractions d'hydroxyproline urinaire de ces sujets en pourcentage :

N° D'ORDRE	Pourcentage d'hydroxyproline de la fraction		
	libre	peptidique fixée sur Dowex 1	peptidique non fixée s/Dowex 1
1	1	36	63
2	1	51	48
3	0,5	26	73,5
4	1	36,5	62,5
5	1	23	76
6	4	39	57

TABLEAU 25 : Répartition de l'hydroxyproline peptidique chez 6 sujets normaux.

Ce tableau nous montre que les peptides non fixés sur Dowex 1 prédominent dans 5 cas sur 6. Leurs quantités sont égales dans le 6ème cas. Nous n'avons pas établi systématiquement le taux de l'élimination d'hydroxyproline par 24 heures chez ces sujets parce qu'il est difficile d'obtenir la collection des urines de 24 heures chez des sujets normaux. Nous verrons dans la dernière partie que les variations de pourcentage de ces peptides apportent déjà des renseignements. Ce serait un progrès important dans l'utilisation des dosages d'hydroxyproline en Chimie clinique, de n'avoir pas à collecter la totalité des urines, ce qui est source d'erreurs et de pertes de temps.

Dans les cas où nous avons mesuré les concentrations des deux types de peptides sur la totalité des urines des 24 heures, nous avons obtenu pour l'hydroxyproline fixée sur Dowex 1 des taux de 7,5 à 20 mg par 24 heures. Le taux d'hydroxyproline peptidique non fixée sur Dowex 1 est compris entre les valeurs 10 et 30 mg par 24 heures.

Au total, cet ensemble de techniques, encore qu'elles ne soient pas toutes conduites à leur terme, nous a permis d'établir un protocole de fractionnement de l'hydroxyproline urinaire utilisable en chimie clinique. Nous allons en voir l'application dans la dernière partie.

o
o o

TROISIEME PARTIE

VALEUR SEMIOLOGIQUE DES DOSAGES D'HYDROXYPROLINE URINAIRE

Il nous reste à indiquer sur quelles bases se fonde à l'heure actuelle notre expérience du dosage de l'hydroxyprolinurie en clinique. Nous disposons pour établir sa valeur d'environ 100 dosages pratiqués sur l'urine de :

- 8 adultes normaux,
- 68 adultes hospitalisés dans divers services du Centre Hospitalier et Universitaire de Reims au cours de l'année 1965-1966, pour des causes variées.
- 3 enfants normaux,
- 9 enfants hospitalisés pour des causes variées.

Il est difficile d'obtenir des séries homogènes de cas se prêtant à une analyse statistique valable et permettant d'établir avec netteté les critères pathologiques de cette sémiologie nouvelle, parce que le nombre de cas à retenir est relativement faible. Par exemple, en un an, nous n'avons dépisté que 3 cas de myélome dans l'ensemble du C.H.U. Le total de nos cas est, forcément hétéroclite.

L'une des principales difficultés du dosage réside dans la nécessité de collecter les urines des 24 heures. La moindre perte provoque une diminution de l'hydroxyprolinurie calculée. Il est donc indispensable que le malade soit coopératif et les infirmières bien entraînées. Chez le nourrisson et l'enfant, la collection des urines pose les problèmes les plus aigus. Comme nous le redirons plus loin, si le rapport entre les taux des diverses fractions d'hydroxyproline peptidique apportait autant de renseignements que le dosage quantitatif de chaque fraction, comme cela nous a paru être le cas, ces difficultés seraient pratiquement résolues. En outre, le délai nécessaire au dosage serait

raccourci, permettant éventuellement d'étendre les indications de ce dosage à des cas d'urgence, qui n'ont jamais été explorés jusqu'ici.

Une autre difficulté, dans l'interprétation des résultats, provient des variations quantitatives d'élimination qu'on peut constater chez un même malade d'un jour à l'autre. Bien que DULL (12) ait affirmé que l'élimination d'hydroxyproline était remarquablement constante chez un même sujet étudié 8 jours durant, d'autres auteurs, comme BENOIT (1) ont montré que l'hydroxyprolinurie variait d'un jour à l'autre de 20 à 50 pour 100 de sa valeur. Nous-mêmes avons constaté, chez certains malades, d'importantes variations. Chez un hyperparathyroïdien, dont l'élimination maximale d'hydroxyproline s'est élevée à 360 mg par 24 heures, la variation la plus grande fut de 90 mg, soit 25 pour 100. Chez un Basedowien, l'hydroxyprolinurie s'abaissa en 2 jours de 124 à 55 mg par 24 heures soit 56 pour 100 de variation, sans cause particulière. Toutefois nous avons constaté que les sujets présentant un taux normal conservaient leur taux normal, tandis que les taux anormaux, en dépit de leurs variations, se maintenaient à des valeurs anormales lors d'examens successifs. Ceci montre qu'il faut répéter les examens et tenir compte des élévations constantes du taux.

Nous allons passer en revue les résultats que nous avons obtenus, classés en fonction des principales indications du dosage, et comparés à ceux des autres auteurs dans le même domaine. Nous en tirerons ensuite des déductions permettant de poser les indications du dosage de l'hydroxyprolinurie.

A - RESULTATS DES DOSAGES : ETUDE COMPARATIVE DE LA LITTERATURE ET DE NOS PROPRES RESULTATS :

Nous avons classé nos résultats en 6 rubriques :

- Hydroxyprolinurie dans les maladies des glandes endocrines
- Hydroxyprolinurie dans les maladies des os,
- Hydroxyprolinurie en rhumatologie,
- Hydroxyprolinurie dans les collagénoses,
- Hydroxyprolinurie au cours d'affections diverses,
- Hydroxyprolinurie chez les enfants.

1 - L'hydroxyproline dans les maladies des glandes endocrines :

Plusieurs auteurs ont étudié l'hydroxyprolinurie dans les maladies de la glande thyroïde. Ils obtiennent dans l'ensemble des résultats élevés, parfois même très élevés. La moyenne de tous les auteurs se situe aux alentours de 80 mg par 24 heures soit le double de la limite supérieure de la normale. Le TABLEAU 26 indique ces résultats. On voit que l'hydroxyproline libre n'a guère retenu l'attention des auteurs.

L'élévation de l'hydroxyprolinurie est un signe fidèle d'hyperthyroïdie, car elle augmente parallèlement à la gravité de la maladie. KIVIRIKKO a établi l'existence d'une corrélation très fortement positive entre hydroxyprolinurie et taux de l'iode sanguin lié aux protéines. On peut suivre les progrès de la thérapeutique à l'aide de ce dosage.

Dans l'hypothyroïdie, les mêmes auteurs ont constaté une baisse générale du taux de l'hydroxyproline, mais moins sensible et moins constante que ne l'est le phénomène inverse dans l'hyperthyroïdie. La diminution est peut-être plus sensible chez la femme. Elle n'est pas suffisante pour permettre son exploitation sémiologique.

On peut se demander quelle est la cause de l'hyperhydroxyprolinurie provoquée par l'hyperthyroïdie. BENOIT (1) a montré que l'injection d'hormone thyroïdienne provoquait une élévation de cette hydroxyprolinurie. On sait que l'hydroxyproline urinaire dérive du collagène. Par des méthodes isotopiques, sur l'animal, PROCKOP (60) a constaté que cette hydroxyproline pouvait à la fois dériver du collagène soluble et insoluble. On ne peut affirmer a priori que l'hormone thyroïdienne agit sur le système de dégradation ou sur le système de biosynthèse du collagène ; le collagène soluble est à la fois le précurseur et le résultat de la dégradation du collagène insoluble. Le même problème se retrouve dans toutes les élévations de l'hydroxyprolinurie : s'agit-il d'une augmentation de la biosynthèse ou du catabolisme du collagène ? L'hormone thyroïdienne accélère probablement les deux en même temps.

On peut se demander aussi quel est le tissu dont le collagène se renouvelle rapidement dans l'hyperthyroïdie. Bien que tous les tissus conjonctifs

	Taux d'hydroxyproline en mg par 24 heures	
	totale	libre
Hyperthyroïdie		
DULL (12)	79-440	
LEJEUNE (41)	55-186	
KIVIRIKKO (32)	H 47,5-260 (89,1) F 35,6-166	
KLEIN (33)	164	
RUBEGNI (65)	48 -125	0,25-0,40
SHILEY (70)	65 -440 (150)	
Hypothyroïdie		
KIVIRIKKO (32)	H 8,4-15,4 F 11,2-12,2	
RUBEGNI	18 -23	0,25-0,28
Hyperparathyroïdie		
DULL	100	
KLEIN	200	
SHILEY	72 -150 (90)	
Hypoparathyroïdie		
KLEIN	29 -37	
Acromégalie		
DULL	74 -77	
LEJEUNE (41)	9,3-80,5	
SHILEY	85 -138 (115)	

TABLEAU 26 : Dosages d'hydroxyproline dans les maladies des glandes endocrines ; cas relevés dans la littérature.

(Les chiffres entre parenthèses représentent les moyennes données par les auteurs).

soient probablement remaniés, c'est avant tout l'os, le plus riche en collagène, qui doit être transformé. Il n'est pas surprenant, dans ces conditions, que l'hyperthyroïdie soit si souvent accompagnée d'un certain degré d'ostéoporose ; et que les formes ostéoporotiques s'accompagnent des plus nettes élévations de l'hydroxyprolinurie.

Le TABLEAU 27 indique nos résultats dans un cas d'hyperthyroïdie, où l'élévation, nette dans tous les cas, a présenté de curieuses variations d'un jour à l'autre. Nous avons aussi dosé l'hydroxyprolinurie dans un cas de tumeur bénigne de la thyroïde : elle était normale. Dans tous ces cas, le taux d'hydroxyproline libre est relativement élevé.

MALADE	DIAGNOSTIC	Taux d'hydroxyproline en mg par 24 h.	
		Totale	Libre
P.	hyperparathyroïdie	275	46,5
	avant	363	66
	opération	292	32
P.	hyperparathyroïdie	69	8
	après	68	8,5
	opération	80	23
B.	hyperthyroïdie	124	2,7
		87	4
		55	4
Le.	tumeur thyroïdienne bénigne	18	3,5
La.	pancréatite aiguë	16,5	0,65
V.	acromégalie	47	3,8
		57	3,3

TABLEAU 27 : Résultats de dosages d'hydroxyproline urinaire chez des malades atteints de divers syndromes endocriniens.

L'hyperparathyroïdie est également une importante cause d'élévation de l'hydroxyprolinurie. Là encore, elle est avant tout liée au métabolisme osseux puisqu'on connaît fort bien le rôle directeur joué par la parathormone dans ce domaine. Les valeurs sont souvent très élevées (voir TABLEAU 26). C'est dans un cas d'hyperparathyroïdie que nous avons personnellement observé nos plus fortes augmentations : plus de 300 mg par 24 heures (TABLEAU 27). Le P présentait une hyperparathyroïdie avec ostéoporose du type Maladie de Von RECKLINGHAUSEN accompagnée de fractures multiples. Nous avons répété nos examens après ablation d'un adénome parathyroïdien volumineux et constaté une sensible baisse de l'hydroxyprolinurie. Nous avons noté que le taux de l'hydroxyproline libre, déjà très élevé avant l'opération, était, en pourcentage encore plus élevé après l'opération. Le taux de l'hydroxyproline totale était loin d'être revenu à la normale, de sorte qu'on peut se demander si l'extirpation de l'adénome avait été totale. Nous n'avons pas un recul suffisant pour en juger.

JOHNSTON (26) a montré que l'extrait parathyroïdien provoquait une rapide élévation de l'élimination d'hydroxyproline chez le sujet normal, et chez l'hypoparathyroïdien. Il n'y a pas de variation sensible chez l'hyperparathyroïdien. KEISER (28) a montré que l'épreuve de perfusion calcique était suivie chez le sujet normal d'une baisse rapide de l'hydroxyprolinurie, tandis que cette épreuve ne provoquait pas de modification de l'hydroxyprolinurie chez l'hypoparathyroïdien. L'utilisation de cette épreuve couplée d'hypercalcémie et hypohydroxyprolinurie mérite donc d'être plus souvent pratiquée.

Nos autres cas portant sur des malades des glandes endocrines ou même exocrines sont isolés. Un sujet atteint de pancréatite présentait une hydroxyprolinurie un peu basse (TABLEAU 27), il est vrai qu'il était sous traitement par l'iniprol depuis plusieurs jours.

Un sujet suspect d'acromégalie présentait une élévation modérée de son hydroxyprolinurie, cadrant avec ce diagnostic, qui n'a pas été confirmé à l'heure actuelle. D'autres auteurs ont montré que l'hydroxyprolinurie s'élève au cours des poussées évolutives de la maladie, et qu'elle est normale dans les cas peu évolutifs. On sait inversement que l'hydroxyprolinurie est

nettement abaissée chez l'enfant présentant un retard de croissance ou un nanisme hypophysaire. JASIN (24) a montré que l'injection d'hormone de croissance provoquait une élévation de l'hydroxyprolinurie.

Cette action de l'hormone somatotrope est en faveur d'une liaison entre l'hydroxyprolinurie et la biosynthèse du collagène, mais BENOIT (1) a constaté de son côté que les anabolisants de synthèse ne provoquent pas d'hyperhydroxyprolinurie. Une fois de plus, les arguments en faveur de l'origine biosynthétique et catabolique de l'hydroxyproline urinaire s'équilibrent.

2 - L'hydroxyprolinurie dans les maladies de l'os :

L'hydroxyprolinurie a été explorée dans le cadre des maladies osseuses. Sans revenir sur son intérêt dans le dépistage de l'hyperparathyroïdie, indiquons dès maintenant qu'elle est élevée dans la maladie de Paget, l'ostéoporose, les cancers secondaires des os, les myélomes, diverses affections congénitales du mésenchyme.

Maladie osseuse de Paget :

L'élévation paraît assez variable selon les malades et selon les auteurs (TABLEAU 28).

AUTEURS	Taux d'hydroxyproline totale observés en mg par 24 h.
KLEIN (33)	31 mg (normale moins de 25 mg
GOLDANICH (16)	90 à 350 mg
DULL (11)	67 à 575 mg
LEJEUNE (41)	26,9 à 998 mg (moyenne 307,8 sur 19 cas)

TABLEAU 28 : Cas relevés dans la littérature : hydroxyprolinurie dans la maladie osseuse de Paget.

Nous croyons que ces valeurs très étalées reflètent assez bien la vérité. On peut voir toutes les sortes d'éliminations d'hydroxyproline dans la maladie de Paget selon le degré d'évolutivité. Nous-mêmes, sur 4 cas, avons

obtenu des résultats très variés, qui sont indiqués sur le TABLEAU 29.

MALADES	Taux d'hydroxyproline en mg par 24 h.		
	totale	libre	particularités
Ta.	85 mg	4,5 mg	fractures spontanées
Fe.	66 mg	4 mg	
Mr.	146 mg	7 mg	gros remaniements osseux
	160 mg	6 mg	
	160 mg	10,5 mg	
Mi.	58 mg	4 mg	remaniement osseux très localisé.

TABLEAU 29 : Hydroxyprolinurie dans la maladie de Paget.

On voit dans l'ensemble que l'hydroxyproline libre suit assez fidèlement l'hydroxyproline totale dans son élévation. Il ne paraît pas possible d'affirmer le diagnostic de maladie de Paget devant une élévation de l'hydroxyprolinurie. Des taux aussi élevés ou plus élevés peuvent être observés dans d'autres syndromes. Par contre, le dosage de l'hydroxyproline urinaire sera utile pour affirmer l'évolutivité de la maladie.

Nous avons étudié dans les deux derniers cas l'élimination des deux variétés de peptides fixés et non fixés sur Dowex. Les résultats sont indiqués sur le TABLEAU 30, qui montre la prédominance des peptides fixés. D'intéressantes déductions physiopathologiques pourraient en être tirées, si ces notions sont confirmées par une plus longue série de cas. En effet, comme nous le verrons plus loin, dans les tumeurs osseuses métastatiques, c'est, semble-t-il, l'inverse qui se produit. Il faut rapprocher cette élimination de peptides acides à hydroxyproline dans la maladie de Paget de l'élimination de peptides acides constatée par KIBRICK (29) en particulier, confirmée par d'autres auteurs et retrouvée par nous (voir plus loin), dans des polyarthrites des tumeurs sans métastase osseuse et un cas d'hyperthyroïdie.

MALADE	peptides fixés		peptides non fixés	
	taux par 24 h.	%	taux par 24 h.	%
Mi.	40 mg	70 %	14 mg	23 %
Mr.	115 mg	80 %	24 mg	15 %
	120 mg	75 %	34 mg	21 %
	118 mg	73 %	32 mg	21 %

TABLEAU 30 : Peptides contenant de l'hydroxyproline dans la maladie osseuse de Paget.

Myélome :

L'élévation de l'hydroxyprolinurie a été peu étudiée. MITOMA (48) donne une valeur moyenne de 51 mg par 24 heures pour l'hydroxyproline totale; de 5 mg pour l'hydroxyproline libre. LEJEUNE (41) donne des valeurs nettement plus dispersées : de 17 à 90 mg d'hydroxyproline totale, avec une moyenne à 52,02 mg pour 10 cas. En fait, il n'y avait d'augmentation de l'hydroxyprolinurie que dans 4 de ces cas.

Nous avons dosé l'hydroxyproline urinaire chez 2 sujets atteints de myélome : elle était égale, respectivement à 29 et 36,6 mg par 24 heures donc normale. L'hydroxyproline libre s'élevait à 2,3 et 1,2 mg par 24 heures. Dans un cas de dysglobulinémie essentielle, les valeurs respectives étaient 21 et 0,6 mg par 24 heures. Les renseignements apportés n'ont donc pas de valeur sémiologique. Nous n'avons pas pratiqué jusqu'ici le fractionnement des peptides à hydroxyproline acides et basiques dans le cas de myélome.

L'ostéoporose :

Dans l'ostéoporose pure, caractérisée par la non fixation du calcium sur la matrice calcaffine (42), il ne devrait exister d'élévation de l'hydroxyprolinurie que si le collagène osseux est lui-même lésé, si son renouvellement est accru. L'élévation de l'hydroxyproline urinaire devrait donc être inconstante et dépendre de la cause de l'ostéoporose. C'est bien ce qu'on a

observé dans la plupart des cas, ainsi que le montre le tableau des valeurs données par différents auteurs (TABLEAU 31).

AUTEUR	Taux limite (mg par 24 h)	Moyenne (mg par 24 h)
GENNARI (15)	12,6-58	40
KLEIN (33)	5 -33	
LEJEUNE (41)		
- ostéoporose sénile	17,2-73	34,1
- ostéoporoses d'autres causes	élévation non chiffrée	
MOSKOWITZ (49)	H 19,8-32,4	
	F 13,5-55	28,1
SMILEY (70)	8 -69	36,0
SMITH (71)	14 -70	37,1

TABLEAU 31 : Taux d'hydroxyproline urinaire dans les ostéoporoses.

Nos propres cas confirment la variabilité de l'hydroxyprolinurie au cours des ostéoporoses (TABLEAU 32)

MALADE	Taux d'hydroxyproline en mg par 24 h.			
	totale	peptidique fixée	peptidique non fixée	libre
G.	130			2,5
	89			2,6
	73			2,3
La.	38	35	1	1,6
E.	56			11,5

TABLEAU 32 : Hydroxyprolinurie au cours des ostéoporoses : cas personnels.

Le malade G. était atteint d'une grande ostéoporose sénile. Les variations de son hydroxyprolinurie totale sont assez remarquables. Dans tous les cas, elle est élevée.

Le malade E. était atteint d'une ostéoporose légère avec décalcification localisée.

Le malade La. est plus intéressant parce que nous avons pu doser les diverses fractions des peptides à hydroxyproline. Nous constatons une prédominance absolue des peptides fixés sur Dowex 1. C'est donc une inversion complète des pourcentages des deux fractions peptidiques qui caractérise ce cas. Nous ne pouvons dire si cet aspect est constant dans l'ostéoporose. Il s'agissait du point de vue clinique, d'une ostéoporose secondaire à une fracture du trochiter, intéressant seulement l'extrémité supérieure de l'humérus, et surtout associée à une arthrite scapulo-humérale. Nous retrouverons ce cas avec les arthrites, car l'inversion des pourcentages des fractions peptidiques d'hydroxyproline paraît caractéristique des affections articulaires.

Par conséquent, il nous est difficile de conclure en raison du faible nombre de cas examinés, qui présentaient tous une certaine élévation de l'hydroxyprolinurie totale. Il faut également tenir compte, dans l'étude de l'hydroxyprolinurie ostéoporotique du sujet âgé, de la baisse de l'hydroxyprolinurie chez le vieillard, bien démontré par divers auteurs (16,71).

Ostéomalacie :

Nous avons dosé le taux d'hydroxyproline urinaire dans un cas d'ostéomalacie vertébrale sénile, qui se doublait cliniquement d'une légère hyperthyroïdie. Malgré cette dernière, il n'existait aucune élévation de l'hydroxyprolinurie totale à 3 examens successifs :respectivement 35-31 et 32 mg par 24 h. L'hydroxyprolinurie libre, un peu plus variable, atteignait le troisième jour un taux un peu élevé : 0,7-2 et 3,9 mg par 24 h. Nous n'avons pas trouvé trace dans la littérature de documents concernant le taux de l'hydroxyprolinurie dans l'ostéomalacie.

Tumeurs osseuses :

Il s'agit là d'une des applications les plus intéressantes de ce do-

sage. De nombreux auteurs ont constaté qu'existait dans les métastases osseuses de cancers une élévation constante de l'hydroxyprolinurie. On a d'abord montré que les cancers des tissus mous, en l'absence de métastases, ne provoquaient pas d'accroissement de l'élimination urinaire d'hydroxyproline. Le tableau 33 fait état de quelques valeurs trouvées dans la littérature et de nos résultats personnels.

On remarque que 2 cancers du poumon ont des taux plus élevés que les autres : nous ne disposons pas encore d'un recul suffisant pour exclure l'existence d'une métastase osseuse latente chez ces malades. Dans l'ensemble, les valeurs de l'hydroxyproline totale sont normales, tandis que l'hydroxyproline libre présente une légère tendance à l'élévation.

AUTEUR		Taux d'hydroxyproline en mg par 24 h.			
		Total	PFD	PNFD	Libre
GRUSSON (20)		10-45 (30)			
PLATT (58)		13-36 (26,6)			
RESULTATS PERSONNELS					
Malades	Tumeur				
A.	vulve	43			4
D.	prostate	26,5			4
R.	oesophage	35			1
B.	mal. Hodgkin	40			2
La.	bronches	49			2
Cr.	utérus	22	6	12	4
G.	larynx	28	18,5	8	1,5
De.	bronches	49	17	29	3
Lo.	bronches	37	20	15	2
	MOYENNE	36,5	15	16	2,7

TABLEAU 33 : Hydroxyprolinurie au cours des tumeurs malignes des tissus mous : PFD : hydroxyproline peptidique fixée sur Dowex 1.

PNFD : hydroxyproline peptidique non fixée sur Dowex 1.

Au contraire, l'élévation de l'hydroxyprolinurie est fréquente et marquée dans les cancers accompagnés de métastases osseuses, comme on peut en juger par le TABLEAU 34, qui recense les valeurs obtenues par un certain nombre d'auteurs. On voit qu'existent des différences importantes selon les malades. Tout le monde constate l'existence d'une corrélation entre l'activité des lésions et l'importance de l'hydroxyprolinurie. Les cas d'hydroxyprolinurie basse correspondent à des formes fixées ou peu actives, dont le pronostic est relativement bon. PLATT (58) a constaté, en suivant un même malade pendant plusieurs mois, que l'hydroxyprolinurie s'élevait peu après l'apparition d'une métastase et croissait parallèlement à celle-ci. Il a noté la chute de l'hydroxyprolinurie chez un malade atteint de cancer de la prostate avec métastase osseuse, au moment de la mise en oeuvre du traitement par les oestrogènes.

GRUSON (20) a classé les cas de métastases osseuses selon leurs 2 variétés, ostéolytique et condensante. Il a constaté que l'élévation de l'hydroxyproline est comparable dans les deux variétés. Encore une fois, nous avons là une preuve que l'hydroxyprolinurie ne reflète pas seulement la biosynthèse ou le catabolisme du collagène, mais bien les deux. Dans les deux variétés, l'intensité de l'hydroxyprolinurie reflète avant tout l'étendue des métastases.

AUTEUR	Taux d'hydroxyproline en mg par 24 h.		
	Valeurs limite	Moyenne	Particularités
GENNARI (15)	44-108	81	
GRUSON (20)	25-120	78,5	ostéolytique
	40-100	71,3	condensant
KLEIN (33)	23- 97		
LEJEUNE (41)	11-173,3	64	
PLATT (58)	13- 97	70	

TABLEAU 34 : Hydroxyprolinurie totale dans les tumeurs avec métastase osseuse.

Notre propre statistique porte sur 11 cas. En fait nous avons groupé ici tous les cas pour lesquels une suspicion de métastases osseuses existait au moment de l'examen. Certains ont été ultérieurement confirmés par exérèse chirurgicale ou prélèvement biopsique, d'autres infirmés. C'est en particulier le cas pour 2 malades âgés, porteurs de dilatation des bronches vérifiées par bronchoscopie et dont l'hydroxyprolinurie était élevée. On voit que la dilatation des bronches constitue un sérieux piège dans l'interprétation sémiologique de ce dosage (TABLEAU 35).

NOM	Localisation de la tumeur		Taux d'hydroxyproline en mg par 24 h.			
	initiale	métastatique	totale	PFD	PNFD	libre
B.	prostate	osseuses très stables	56 54 65 53			1,6 1,5 1,7 1,7
Ba.	sein	fémur	52			
De.	col. utérin	fémur (très discutable)	30 39			
H.	maxillaire	évolutive	70			7
Ma.	sarcome sternal	peu évolutif	36			0,25
No.	utérus	iliaque (peu évolutive)	26	11,5	13	1,5
Co.	sigmoïde	coulée très étendue, sans preuve absolue d'atteinte os.	106	75	29	2
Pu.	poumon	fémur, sûre	71	32	35	4
Dr.	poumon	médiastinale l'extension aux os n'est pas prouvée.	64	42,5	16	5,5
Lo.	poumon	vertébrale	72	27,5	42	2,5
De.	dilatation des bronches		101	67	23	11
DeB.	dilatation des bronches		44	21,5	21	1,5

TABLEAU 35 : Cas suspects de métastases osseuses. Valeur des fractions de l'hydroxyproline peptidique urinaire.

C'est ici peut être que le dosage des deux fractions peptidiques d'hydroxyproline revêt un intérêt majeur. En effet, nous avons constaté, sur notre série de tumeurs, que les métastases osseuses avérées s'accompagnaient toujours d'une prédominance de peptides non fixés sur Dowex 1. Au contraire, les lésions étendues des tissus mous provoquent ou peuvent provoquer une élévation des peptides acides, fixés sur Dowex 1, qui expliquerait, pensons-nous, l'élévation de l'hydroxyprolinurie totale parfois constatée dans des cas de tumeurs sans métastase. Il ne faut pas oublier que les peptides acides contenant de l'hydroxyproline ont été décrits dans le cas de lésions des tissus mous (arthrites en particulier) et jamais dans le cas de lésions osseuses métastatiques. Remarquons aussi que les peptides fixés sur Dowex 1 étaient élevés dans nos cas de maladie de Paget et d'ostéoporose. Il est permis de se demander si l'élévation du taux de peptides neutres ou basiques contenant de l'hydroxyproline n'est pas plus caractéristique des métastases osseuses que l'élévation de l'hydroxyprolinurie totale (TABLEAU 35).

Ce tableau nous montre que dans les trois cas de métastase osseuse certaine où nous avons opéré le fractionnement des deux types de peptides, c'est l'hydroxyproline peptidique non fixée sur Dowex 1 qui était la plus élevée. Dans les autres cas, l'élévation de l'hydroxyproline coexistait avec un envahissement des tissus mous. Si nous reprenons maintenant les cas de tumeurs sans métastase avérée indiqués sur notre tableau 35, nous constatons que 2 malades présentent une quantité de peptides non fixés supérieurs aux peptides fixés. Le premier, Cr., ayant une hydroxyprolinurie totale basse, peut-être disjoint. Par contre, le second, De., cancer des bronches, présente une nette élévation à 49 mg de son hydroxyprolinurie totale, avec environ 60 pour 100 de peptides non fixés. L'existence d'une métastase osseuse chez ce malade, n'est pas cliniquement impossible. Seule, l'évolution ultérieure permettra de la vérifier.

En définitive, sur 20 dosages des diverses fractions d'hydroxyproline peptidique, avec élévation de l'hydroxyproline totale, nous avons observé 5 fois seulement une augmentation de l'hydroxyproline peptidique non fixée sur Dowex 1 : 3 métastases osseuses certaines, 1 possible mais non vérifiée, un cas d'ascite très volumineuse, avec épreuves fonctionnelles hépatiques nor-

males qu'on hésite à ranger dans le cadre des cirrhoses. Il est évident que l'étude de la valeur sémiologique de ce dosage doit être poursuivie.

3 - Hydroxyprolinurie en rhumatologie :

L'intérêt de l'hydroxyproline urinaire en rhumatologie a été initialement démontré par KIBRICK, dont les beaux travaux indiqués dans la première partie, ont mené à l'isolement de peptides acides contenant de l'hydroxyproline (45). KIBRICK, chez un sujet atteint d'arthrite rhumatoïde, isole environ 60 mg de peptides acides, contenant en particulier de l'acide glutamique. Du point de vue sémiologique, ZIFF (78) constate que l'hydroxyprolinurie s'élève chez les enfants atteints de rhumatisme, mais trouve l'augmentation faible et inconstante. Il est certain que chez l'enfant, où les taux d'hydroxyproline sont très variables, la valeur de l'augmentation est toujours discutable. SMITH (72) distingue les polyarthrites chroniques non évolutives, dans lesquelles le taux reste peu élevé ou normal : 30 à 45 mg par 24 h. et les polyarthrites chroniques évolutives, où le taux est franchement pathologique, au moins chez l'adulte : 61 à 124 mg par 24 h. LEJEUNE (41) plus récemment, confirme l'élévation de l'hydroxyprolinurie dans les cas de polyarthrite chronique évolutive et le taux normal dans les cas stabilisés. On dispose en fait de bien d'autres tests d'inflammation aussi valables, de sorte que ces constatations manquent peut-être d'intérêt sémiologique.

En ce qui nous concerne, nous n'avons pas étudié de cas relevant de la rhumatologie. Nous ne ferons état que d'un seul cas, le malade La., que nous avons déjà signalé dans le chapitre des ostéoporoses. Ce malade avait aussi une forte arthrite scapulo-humérale : son hydroxyprolinurie totale était normale, mais son pourcentage des deux formes peptidiques était inversé les peptides non fixés sur Dowex étant presque absents. Il serait donc intéressant d'étudier les taux de ces deux formes d'hydroxyproline peptidiques dans les diverses formes de rhumatismes. Nous envisageons de l'entreprendre.

4 - Maladies du collagène :

On a naturellement étudié l'hydroxyproline urinaire, produit d'excrétion du collagène dans les maladies dites du collagène. Les résultats pa-

raissent à l'heure actuelle décevants, confirmant encore une fois que ces maladies dites du collagène touchent en fait bien davantage d'autres constituants du tissu conjonctif. Nous avons réuni sur le TABLEAU 36 les résultats de quelques auteurs :

SYNDROMES	AUTEURS	Taux d'hydroxyproline	
		Totale	Libre
Sclérodermie	MEILMAN	52	1
	SMILEY	61 à 71	
	SMITH	39 à 71	
Dermatomyosite	SMITH	26 à 97	
Lupus éryth.	MEILMAN	44	1
Périartérite noueuse	SMITH	46 à 71	

TABLEAU 36 : Hydroxyprolinurie dans les maladies du "collagène".

En ce qui nous concerne, nous avons étudié l'hydroxyprolinurie de 4 sujets atteints de sclérodermies ou de collagénoses voisines. Dans l'un de ces cas, le fractionnement des peptides a été réalisé, montrant la prédominance de peptides acides fixés sur Dowex 1, comme dans le cas des maladies rhumatismales (TABLEAU 37). On remarquera aussi que le taux d'hydroxyproline libre est très élevé chez ce malade.

MALADES	Taux d'hydroxyproline en mg par 24 h.			
	Totale	PFD	PNFD	Libre
P.	23			0,6
Ga.	30			0,7
Gi.	37			3
O.	79	56	15	8

TABLEAU 37 : Hydroxyprolinurie de sujets atteints de sclérodermie.
PFD : Hydroxyproline peptidique fixée sur Dowex 1.
PNFD: Hydroxyproline peptidique non fixée sur Dowex 1.

5 - Affections diverses :

Nous avons étudié une assez grande série de cirrhotiques, chez lesquels les valeurs de l'hydroxyproline sont assez variables. Il existe des cas d'élévation, qu'il faut probablement rattacher à l'existence d'ostéoporose plus ou moins latentes. Une constatation nouvelle se dégage d'un certain nombre de cas, c'est que la présence d'une ascite s'accompagne souvent d'une nette élévation de l'hydroxyprolinurie, quelle que soit l'étiologie de l'ascite, cirrhotique ou néoplasique, en l'absence semble-t-il, de troubles osseux associés (TABLEAU 38).

Bien que nos cas d'épanchements soient peu nombreux, ils permettent de penser qu'en dehors de l'os, ce sont les séreuses qui fournissent le plus d'hydroxyproline ; péritonéale, pleurale ou synoviale. L'étude doit, là encore, être poursuivie.

MALADES	Taux d'hydroxyproline en mg par 24 h.		PARTICULARITES
	totale	libre	
Ja.	24	3	cirrhose
Pe.	47	5,2	cirrhose
Ho.	42	1,5	cirrhose
Li.	36	4	cirrhose
Ri.	56	3	cirrhose
Co.	25	0,25	cirrhose
Bl.	67,5	7,5	
	40	3	cirrhose
Ra.	66	21	cirrhose, forte ascite, petit diabète
Di.	35	3	cirrhose
Col.	100	2,7	carcinomatose péritonéale à point de départ ovarien
Iz.	61	1,5	pleurésie néoplasique (sans métastase os).

TABLEAU 38 : Cirrhoses et épanchements divers.

Nous avons rencontré un cas d'élimination de protéine soluble riche en hydroxyproline. Il s'agissait d'un malade hospitalisé à la suite de l'ingestion d'un litre de rhum et présentant les signes d'une intoxication éthylique aiguë. Il sortit du coma initial en restant porteur d'une néphrite avec protéinurie (5 g par 24 h.). Son hydroxyproline urinaire totale s'élevait à 89 mg, répartie en libre 2,5 mg, peptidique fixée sur Dowex 1 12,5 mg, peptidique non fixée 89 mg. Ceci pose le problème de l'émission de protéines urinaires contenant de l'hydroxyproline dans les néphrites, signalée par MANUEL (43), et de leur physiologie.

7 - L'hydroxyprolinurie chez les enfants :

Ce chapitre, très vaste, n'a pas encore été aussi bien exploré qu'il aurait dû l'être, peut-être parce que la chromatographie des acides aminés est entrée en pratique courante : elle peut dépister l'hydroxyproline urinaire mais ne permet, en fait, d'explorer que les cas où elle est très élevée, et ne renseigne pas sur l'hydroxyprolinurie totale. De ce fait, les variations des fractions d'hydroxyproline urinaire passent inaperçues. Une autre difficulté s'y ajoute : les taux d'hydroxyproline urinaire sont très variables selon l'âge. On peut admettre qu'ils se placent entre 17 et 45 mg par jour entre 0 et 1 an, et entre 15 et 150 mg par jour entre 1 et 10 ans (16). L'élévation est toujours difficile à affirmer.

Le TABLEAU 39 groupe les taux publiés jusqu'ici dans la littérature.

Nous avons étudié une courte série de cas, d'enfants d'âge divers et atteints de troubles très variés. Les résultats sont donnés par le TABLEAU 40. Peu de conclusions sortent de ces dosages en nombre insuffisant, si ce n'est que dans l'ensemble, les taux d'hydroxyproline totale sont faibles dans toute la série et l'hydroxyproline libre nettement élevée dans les cas de rachitisme, surtout quand on l'exprime en pourcentage de l'hydroxyproline totale.

AUTEURS	Maladies congénitales du tissu conjonctif			
	Marfan	Hurler	Morquio	Ostéogenesis imperfecta
GOIDANICH (16)			63 à 95	39,7 à 53,7 mg par 24 h.
JASIN (24)		17		
HEILMAN (46)	80 libre 1	26 libre 1		
RAVENNI (64)	106 libre 0,8			
SHILEY (70)	18 à 106			
SMITH (72)	57 à 73	13		27 à 156
	Maladies du développement			
	nanisme	crétinisme	carences	rachitisme
DULL (12)	32 à 42			
JASIN (24)	14 à 41	5 à 11		
PICOU (55)			taux faibles	
PLAQUET (57)				taux élevés
SATKEWAR (67)			taux faibles	
SHILEY (70)	14 à 18	5 à 17		

TABLEAU 39 : Hydroxyprolinurie dans divers syndromes infantiles.

ENFANT	AGE		Taux des diverses fractions d'hydroxyproline en mg par 24 h.			
		Totale	PFD	PNFD	Libre	Syndrome
D.	10	48	33,5	10,5	4	Sarcome d'Ewing
H.	10 mois 12 kg	21	13	7	1	Bronchite
F.	13 mois 7,8 kg	6	0	2	4	Rachitisme
B.	7 mois 8,5 kg	30,5	17	8,5	5	Rachitisme
M.	9 mois 3,5 kg	7	5,3	1	0,7	Mongolisme Malformations
De.	9 mois 7,5 kg	12	8,5	2,5	1	Etat neurotoxique
V.	2 mois 3,5 kg	24	9,5	13	1,5	Athrepsie
S.	3 mois 2,4 kg	12	7	0	5	Prématuré Hypotrophique

TABLEAU 40 : Dosage des diverses fractions d'hydroxyproline urinaire chez le nourrisson ou l'enfant.

PFD : Hydroxyproline peptidique fixée sur Dowex 1

PNFD: Hydroxyproline peptidique non fixée sur Dowex 1.

C'est effectivement chez l'enfant et le nourrisson que le dosage de l'hydroxyproline libre paraît être le plus intéressant. C'est d'abord un signe de rachitisme sur lequel beaucoup d'auteurs ont insisté, conjointement avec l'élévation du taux de certains peptides à hydroxyproline comme le dipeptide pro-hypro. C'est aussi un signe de maladie de Wilson et de syndrome de Toni-Debré-Fanconi, comme l'a montré récemment KLEIN (36). Dans ce cas, l'élévation de l'hydroxyprolinurie dépend d'un trouble de la réabsorption tubulaire des acides aminés et non d'une atteinte du tissu conjonctif. L'élévation du taux de l'hydroxyproline libre est enfin énorme dans un syndrome tout à fait particulier, isolé par EFRON (13), (14) et qui est dû à l'absence congénitale de l'enzyme oxydant l'hydroxyproline en acide pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylique, ou hydroxyproline-oxydase (voir le schéma métabolique dans l'introduction de cette thèse). L'hydroxyproline s'accumule dans le sang et l'urine où on en trouve des quantités de l'ordre de 300 mg par 24 heures. Dans un cas décrit par EFRON, il y avait 285,4 mg d'hydroxyproline libre et 39,4 mg d'hydroxyproline peptidique. Ce syndrome s'associe à d'importants troubles du développement et à un retard mental.

Au total, l'hydroxyproline est, chez l'enfant, un symptôme de valeur, en particulier l'hydroxyprolinurie libre. Notre méthode de séparation sur colonne permet évidemment de la détecter facilement.

B - PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ELEVATION DE L'HYDROXYPROLINE URINAIRE ET DE SES DIVERSES FRACTIONS :

L'utilisation clinique des résultats d'un dosage biochimique ne peut-être fructueuse que si la physiopathologie de l'anomalie est connue : à notre époque il n'est plus admissible de se contenter de résultats empiriques.

Il reste bien des points obscurs dans la physiopathologie de l'hydroxyprolinurie. Ceci s'explique si l'on songe que l'hydroxyproline est une petite molécule dérivant de la macromolécule collagène. Nous rencontrons donc dans son étude certaines difficultés inhérentes à toute exploration des macromolécules, structure difficile à établir, métabolisme connu indirectement , pa-

thologie imprécise. En revanche, les formes urinaires d'hydroxyproline sont des molécules assez petites pour se prêter à un examen direct, nous donnant à son tour des renseignements sur le collagène initial : c'est un avantage considérable. Il peut être exploité dans les trois domaines de la structure du métabolisme et de la pathologie.

1 - Aspect structural :

L'essentiel de l'hydroxyproline urinaire se trouve sous forme de peptides. Selon toute vraisemblance, l'enchaînement d'acides aminés de ces peptides est le même que celui de certains fragments des chaînes peptidiques du collagène dont ils dérivent. Il est relativement facile d'établir la structure de ces peptides et d'en tirer des déductions sur la structure du collagène. C'est un cas particulier, naturel, de la méthode des "finger prints". La plupart des travaux consacrés à la structure des peptides urinaires contenant de l'hydroxyproline a été faite dans ce but, par exemple les travaux de KIBRICK (29).

Toutefois, il n'est pas absolument prouvé que le collagène soit constitué par un enchaînement d'acides aminés strictement identique dans tous les organes qui en contiennent. Les études de la structure, du collagène humain ne sont pas suffisamment avancées pour qu'on puisse affirmer par exemple que l'enchaînement d'acides aminés constitutifs du collagène osseux est rigoureusement identique à celui du tissu synovial.

Dans ces conditions, on pourrait envisager, en comparant la structure des peptides urinaires contenant de l'hydroxyproline à celle du collagène de divers organes, d'assigner une origine précise à chaque type de peptides, soit osseuse, soit synoviale par exemple. Ceci pourrait fournir un diagnostic de localisation de l'organe ou des organes malades, chez un sujet présentant une élévation de l'hydroxyprolinurie.

2 - Aspect métabolique :

Nous avons déjà fait allusion à la discussion passionnée entre ceux qui considèrent les peptides urinaires contenant de l'hydroxyproline comme

dérivés cataboliques du collagène et ceux qui les tiennent pour des dérivés de formes jeunes, immatures, de collagène, dont la synthèse n'a pas totalement abouti.

Il nous semble qu'existent des preuves très nettes en faveur des deux mécanismes à la fois, et qu'elles sont de forces égales. C'est au cours de l'adolescence que s'édifie le tissu conjonctif et osseux, et c'est pendant cette période que l'urine est la plus riche en hydroxyproline. C'est au contraire pendant la sénescence, à l'époque où le catabolisme du collagène l'emporte sur son anabolisme, qu'on trouve les taux d'hydroxyproline urinaire les plus bas.

Il existe une forte hydroxyprolinurie dans les syndromes de destruction et de reconstruction simultanée de l'os, qu'il s'agisse de la maladie osseuse de Paget, de l'acromégalie ou des métastases osseuses des cancers, du type ostéo-condensant comme du type ostéolytique.

On constate une intense hydroxyprolinurie dans les syndromes de dégradation pure du collagène osseux, comme l'hyperostéolyse provoquée par l'adénome parathyroïdien, qui constitue l'une des causes d'élévation majeure. Les hypoostéoidoses elles-mêmes provoquent une augmentation des taux d'hydroxyproline urinaire.

Par conséquent, l'hydroxyprolinurie reflète vraisemblablement le pool de tropocollagène de l'organisme, forme soluble de collagène, en équilibre avec le collagène insoluble, dont il est probablement à la fois le précurseur et la première forme de dégradation. En fait, il reste à prouver que la première forme de dégradation de la fibre collagène est réellement un collagène soluble identique au tropocollagène.

De toutes façons, les peptides contenant de l'hydroxyproline présents dans l'urine dérivent de ce tropocollagène par action de protéases. Celles-ci sont pratiquement inconnues, que ce soit dans leur localisation ou dans leur spécificité. Elles peuvent être situés dans le tissu conjonctif proprement dit, ou dans le foie et le rein. Par conséquent, la fragmentation du tropocollagène en peptides ne dépend pas seulement du tissu conjonctif, mais aussi

du foie : l'état de cet organe ne peut-il intervenir sur l'hydroxyprolinurie ? Il ne faut pas oublier que l'activité de l'hydroxyproline-oxydase hépatique est normalement très forte, et capable de détruire la totalité de l'hydroxyproline parvenant à cet organe. Dans quelles conditions l'insuffisance hépatique peut-elle provoquer une élévation de l'hydroxyprolinurie, et une modification de la structure des peptides urinaires contenant de l'hydroxyproline?

Chaque peptidase est spécifique d'un type de liaison peptidique et libère par conséquent toujours les mêmes peptides à partir d'une molécule protéique donnée. La nature chimique des peptides contenant de l'hydroxyproline présents dans l'urine pourrait nous renseigner sur le lieu où ils ont été formés. Il faut remarquer à ce propos que la structure de ces peptides, indiquée par ZIFF (78) fait apparaître de grandes analogies en ce qui concerne leur extrémité N terminale, constituée presque toujours par un résidu d'hydroxyproline. Dérivent-ils tous de l'activité de la même prolidase ?

Au contraire, certains peptides acides contenant de l'hydroxyproline, très différents des précédents, apparaissent dans l'urine des sujets porteurs de polyarthrite chronique évolutive. Il est difficile de savoir s'ils dérivent d'un collagène anormal ou s'ils sont formés par des protéases anormales à partir d'un collagène normal.

Enfin, il ne faut pas oublier que le tubule rénal intervient dans la réabsorption ou dans l'élimination des acides aminés et des peptides. Son état physiologique joue donc probablement sur l'élimination de peptides contenant de l'hydroxyproline. On pourra mieux évaluer ce facteur lorsque le dosage de l'hydroxyproline plasmatique sera entré en pratique courante.

3 - Aspect physiopathologique :

Tout ce qui précède nous montre l'intérêt de la séparation et du dosage des diverses formes peptidiques d'hydroxyproline urinaire, que nous avons tenter de réaliser par fractionnement sur résine Dowex 1. La série relativement faible de cas que nous avons examinés nous a montré que les peptides acides contenant de l'hydroxyproline sont éliminés en quantité accrue dans un grand nombre de maladies osseuses et dans tous les cas d'atteinte du col-

lagène des tissus mous entraînant une élévation de l'hydroxyprolinurie. Seules, jusqu'à maintenant, les métastases osseuses de tumeurs malignes nous ont donné une élévation des peptides basiques, non fixés sur résine Dowex.

En fonction de ces données, des résultats des autres auteurs et de nos propres résultats, nous schématiserons ainsi les indications du dosage et du fractionnement de l'hydroxyproline urinaire.

a) Dépistage des métastases osseuses de tumeurs :

Dosage de l'hydroxyproline totale et de la forme peptidique non fixée sur Dowex 1.
C'est l'indication majeure du dosage.

b) Dépistage de l'hyperparathyroïdie dans sa forme osseuse et surveillance du traitement :

Dans ce cas, toutes les formes d'hydroxyproline urinaire doivent être surveillées, l'hydroxyproline libre étant également élevée.

c) Dépistage de la maladie osseuse de Paget, de l'hyperthyroïdie

L'hydroxyprolinurie peut avoir dans ces cas une valeur d'appoint, et permettre d'éliminer certains cas douteux.

d) Recherche des divers syndromes du nourrisson dans lesquels l'hydroxyproline libre est élevée :

Maladie de Wilson, maladie de Toni-Debré-Fanconi, rachitisme, maladie de Efron.

e) Etude biologique des arthrites évolutives :

Dans ce dernier cas, l'arsenal des tests d'évolutivité est déjà très complet. L'intérêt d'un examen est discutable, à moins qu'il n'apporte des éléments particuliers : c'est ce que nous indiqueront les études ultérieures.

R E S U M E E T C O N C L U S I O N S

Nous avons passé en revue les méthodes de dosage de l'hydroxyproline urinaire. La plupart de ces méthodes sont basées sur l'oxydation de l'hydroxyproline en pyrrole, suivie de la condensation de celui-ci avec le para diméthylamino-benzaldéhyde, fournissant une substance colorée en rouge permettant un dosage colorimétrique (réaction de NEUMAN et LOGAN). Nous avons comparé les diverses variantes techniques et les résultats qu'elles fournissent.

Nous avons étudié les méthodes de fractionnement de l'hydroxyproline urinaire en hydroxyproline libre proprement dite et en peptides contenant de l'hydroxyproline, par chromatographie sur colonne de résines échangeuses d'ions Dowex 50 ou AMBERLITE IR 120, qui ont été employées par plusieurs auteurs, et ont permis d'isoler et de caractériser un certain nombre de peptides à hydroxyproline.

En fonction des données précédentes et de nos propres essais, nous avons établi une méthode de séparation et de dosage des diverses fractions d'hydroxyproline urinaire. L'hydroxyproline totale est hydrolysée par ClH en solution 6,0 N. L'hydrolysat, dépourvu de ses pigments par passage sur charbon végétal, est dosé par la réaction colorée de NEUMAN et LOGAN. Nous avons étudié systématiquement tous les facteurs susceptibles d'interférer dans ce dosage : pH, concentration en ions minéraux, acides aminés, osamines, durée d'hydrolyse, passage sur charbon.

Les fractions peptidiques et libre d'hydroxyproline sont séparées par chromatographie sur résine Dowex 1 en phase OH^-. Une fraction peptidique n'est pas fixée sur cette résine ; elle passe dans l'effluent. Il s'agit de peptides basiques.

L'hydroxyproline libre et les peptides acides contenant de l'hydroxyproline sont fixés sur résine Dowex 1. Ils en sont élués par une solution de NaCH ou de KOH 1,0 N. L'hydroxyproline libre est dosée directement dans cet éluat par la méthode de NEUMAN et LOGAN modifiée en conséquence. Les peptides acides sont hydrolysés per une solution de ClH 6,0 N et leur hydroxyproline est dosée. On obtient ainsi les taux de peptides à hydroxyproline fixés, appelés PFD et PNFD.

Nous avons entrepris ensuite une purification plus poussée de ces peptides par électrophorèse et chromatographie sur papier, afin de préciser leur structure.

Nous avons étudié systématiquement les résultats des dosages d'hydroxyproline urinaire consignés dans la littérature des dix dernières années et constaté que les taux d'hydroxyproline urinaire totale étaient essentiellement élevés dans les maladies des os telles que les formes osseuses de l'hyperparathyroïdie, la maladie de PAGET, les métastases osseuses des cancers. L'atteinte du collagène des parties molles provoque beaucoup plus rarement une élévation de l'hydroxyprolinurie.

Nos propres dosages, pratiqués sur une centaine de malades du C.H.U de Reims, confirment ces données. Nous avons en outre étudié systématiquement le taux de l'hydroxyproline libre, que nous avons toujours trouvé très faible,

même en cas de forte élévation de l'hydroxyproline totale. Dans un cas d'hyper parathyroïdie, toutefois, le taux de l'hydroxyproline libre était élevé d'environ 10 fois et la proportion d'hydroxyproline libre s'est encore accrue après ablation d'un adénome parathyroïdien.

Le dosage de l'hydroxyproline contenue dans les peptides acides, fixés sur résine Dowex 1, pratiqué dans la moitié environ des cas, nous a montré que cette fraction était la plus variable en pathologie, tandis que la fraction peptidique basique conserve des taux assez constants chez le sujet normal et le malade.

Dans quelques cas, cependant nous avons noté une élévation du taux de ces peptides basiques. Ces cas sont discutés. Ils semblent correspondre fidèlement à l'existence de métastases osseuses de tumeurs.

Cette méthode de fractionnement, suffisamment simple pour être utilisée en chimie clinique, est donc susceptible d'apporter des renseignemants sémiologiques plus étendus que le dosage de l'hydroxyproline totale.

Enfin, nous discutons, à la lumière d'arguments biologiques, métaboliques et cliniques, l'origine exacte de l'hydroxyproline urinaire, produit du catabolisme du collagène osseux, ou au contraire résultat d'un catabolisme précoce de formes jeunes de collagène n'ayant pas eu le temps de s'incorporer dans le collagène insoluble.

Vu le Président de Thèse

Pr. Pierre DESGREZ

Vu le Doyen de Faculté

Pr. G. BROUET

Vu et PERMIS d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

J. R O C H E

B I B L I O G R A P H I E

(1) BENOIT (F.L.), THEIL (G.B.), WATTEN (R.H.),
Metabolism, 12, 1072 (1963)

(2) BERGMANN (I.), LOXLEY (R.),
Anal Chem. 35, 1961 (1963)

(3) BISERTE (G.), BRETON (A.), FONTAINE (G.),
Arch. Fr. Pédiat. 12, 988 (1955).

(4) BLOMFIELD (J.), FARRAR (J.F.),
Anal. Chem. 36, 950 (1964)

(5) BONADONNA (G.), SONENBERG (M.) MERLINO (H.J.),
Metabolism, 14, 832 (1965).

(6) BOULANGER (P.) BISERTE (G.)
Exp. Ann. Biochim. Med. 18, 123 (1956)

(7) CARSTEN (M.E.)
J. Am. Chem. Soc. 74, 5 954 (1952)

(8) CHERIAN (M.G.) RADHAKRISHNAN (A.N.)
Biochem. Biophys. Acta. 101, 241 (1965)

(9) COMBAUD (A)
Thèse Doctorat en Médecine, Lille, 1959

(10) DAHL (O.), PERSSON (K.)
Acta Chem. Scand. 17, 2 499 (1963)

(11) DULL (T.), HENNEMAN (P.H.),
J. Clin. Invest. 41, 1355 (1962)

(12) DULL (T.), HENNEMAN (P.H.),
New Engl. J. Med. 268, 132 (1963).

(13) EFRON (M.L.) BIXBY (E.M.), PALATTAO (L.G.) PRYLES (C.V.),
New Engl. J. Med. 267, 1193 (1962).

(14) EFRON (M.L.), BIXBY (E.M.) PRYLES (C.V.)
New Engl. J. Med. 272, 1299 (1965).

(15) GENNARI (C.), RUBEGNI (M) FORCONI (S) ROMANO (S)
Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 41, 508 (1964).

(16) GOIDANICH (I.F) LENZI (L) SILVA (E)
Clin. Chim. Acta 11, 35 (1965).

(17) GOLDSTONE (A) ADAMS (E)
J. Biol. Chem. 237, 3476 (1962)

(18) GRIGNARD (V)
19,20 Masson Ed. Paris 1953.

(19) GRUSON (M.) RICKEWAERT (A) HIOCO (D) LANHAM (C) DE SEZE (S)
Rev. Rhumat. 33, 23 (1966).

(20) GRUSON (M) RICKEWAERT (A) HIOCO (D) LANHAM (C) DE SEZE (S)
Path. Biol. 14, 210 (1966).

(21) HURYCH (J) CHVAPIL (M)
Bilchem. Biophys. Acta, 107, 91 (1965).

(22) HUTTERER (F) SINGER (E.J)
Anal. Chem. 32, 556 (1960)

(23) HUTTUNEN (J.K) MIETTINEN (T.A)
Acta Chem. Scand. 19 1486 (1965)

(24) JASIN (H.E) FINK (C.W) WISE (W) ZIFF (M)
J. Clin. Invest. 41, 1928 (1962).

(25) JEPSON (J.B.) SMITH (I)
Nature 172, 1100 (1953)

(26) JOHNSTON (C.C) DEISS (W.P)
Metabolism 14, 523 (1965).

(27) JONES (C.R) BERGMAN (M.W) PIGMAN (W.W)
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 115, 85 (1964)

(28) KEISER (M.R) GILL (J.R) SJOERDSMA (A) BARTTER (F.C)
J. Clin. Invest. 43, 1073 (1964).

(29) KIBRICK (A.C) HASHIRO (C.Q) SAFIER (L.B)
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 109, 473 (1962)

(30) KIBRICK (A.C) HASHIRO (C.G) WALTERS (M.I) MILHORAT (A)
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 118, 62 (1965).

(31) KIVIRIKKO (K.I) KOIVUSALO (M) LAITINEN (O) LAMBERG (B.A)
J. Clin. Endocrinol. Metab. 24, 222 (1964)

(32) KIVIRIKKO (K.I) LAITINEN (O) LAMBERG (B.A)
J. Clin. Endocrinol. Metab. 25, 1347 (1965)

(33) KLEIN (L) LAFERTY (F.W) PEARSON (O.H) CURTISS (P.H)
Metabolism 13, 272 (1964)

(34) KLEIN (L) KAPLAN (A) UDENFRIEND (S) SJOERDSMA (A)
J. Biol. Chem. 239, 3350 (1964)

(35) KLEIN (L)
Metab. Clin. Exptl. 13, 286 (1964)

(36) KLEIN (L) TEREE (T.M)
New Engl. J. Med. 273, 771 (1965)

(37) KOEVOET (A.L) Clin. Chim. Acta 12, 232 (1965)

(38) LABADIE (M) NEUZIL (E) BRETON (J.C)
Bull. Soc Chim. Biol. 47, 2125 (1965)

(39) LANG (K)
Z. Physiol. Chem. 219, 148 (1933)

(40) LEACH (A.A)
Biochem. J. 74, 70 (1960)

(41) LEJEUNE (E) RUITTON (P) NOEL (G.) VOLLE (L) BOUVIER (M) BERTRAND (J.N) GRABER-DUVERNAY (B)
Rev. Rhumat. 33, 30 (1966)

(42) LICHNITZ (A) PARLIER (R)
Calcium et maladies du métabolisme des os. 3 vol. Expansion ed. Paris 64.

(43) MANUEL (Y) Symp. Int. Chim. Biochim. tissu conj. Lyon 1965.

(44) MARTIN (C.J) AXELROD (A.E)
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 83, 461 (1953)

(45) MECHANIC (G) SKUPP (S.J) SAFIER (L.B) KIBRICK (A.C)
Arch. Biochem. Biophys. 86, 71 (1960).

(46) MEILMAN (E) URIVETSKY (M.M) RAPOPORT (C.M)
J. Clin. Invest. 42, 40 (1963)

(47) MEISTER (A) STONE (N) MANNING (J.M)
Adv. Chem. Ser. 44, 67 (1964).

(48) MITOMA (S) SMITH (T.E) DAVIDSON (J.D) UDENFRIEND (S) DA COSTA (E.M) SJOERDSMA (A)
J. Lab. Clin. Med. 53, 970 (1959)

(49) MOSKOWITZ (R.W) KLEIN (L.R) KATZ (D)
Arthr. Rheum. 8, 61 (1965)

(50) MYHILL (D) JACKSON (D.S)
Anal. Biochem. 6, 193 (1963)

(51) NEUHAUS (O.W) LETZRING (M)
Anal. Chem. 29, 1230 (1957)

(52) NEUMAN (R.E) LOGAN (M.A)
J. Biol. Chem. 186, 549 (1950)

(53) OGLE (J.D) ARLINGHAUS (R.B) LOGAN (M.A)
J. Biol. Chem. 237, 3667 (1962)

(54) PETERKOFSKY (B) UDENFRIEND (S)
Proc. Nat. Acad. Sci 53, 335 (1965).

(55) PICOU (D) ALLEYNE (G.A) WATERLOW (J.C) SEAKINS (A)
Biochem. J. 95, 18 p (1965)

(56) PLAQUET (R)
Thèse Doctorat Pharmacie Lille 1955.

(57) PLAQUET (R) BISERTE (G) BOULANGER (P)
Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 393 (1960).

(58) PLATT (W.D) DOOLITTLE (L.H) HARTSHORN (W.S)
New Engl. J. Med. 271, 287 (1964)

(59) PROCKOP (D.J) JUWA (K)
Proc. Natl. Acad. Sci. New-York 53, 661 (1965)

(60) PROCKOP (D.J)
J. Clin. Invest. 43, 453 (1964).

(61) PROCKOP (D.J) SJOERDSMA (A)
J. Clin. Invest. 40, 843 (1961).

(62) PROCKOP (D.J) UDENFRIEND (S)
Anal. Biochem. 1, 228 (1960)

(63) RADHAKRISHNAN (A.N) MEISTER (A)
J. Biol. Chem. 226, 559 (1957).

(64) RAVENNI (G) RUBEGNI (M) GENNARI (C) FORCONI (S)
Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 41, 352 (1964)

(65) RUBEGNI (M) GENNARI (C) RAVENNI (G) FORCONI (S) BENCINI (M)
Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 41, 355 (1964)

(66) RYDON (H.N) SMITH (N.G)
Nature 169, 922 (1952)

(67) SATVEKAR (K) RADHAKRISHNAN (A.N)
Clin. Chim. Acta 10, 284 (1964)

(68) SEAKINS (J.W.T)
Biochem. J. 84, 115 P (1962)

(69) SERAFINI-CESSI (F) CESSI (C)
Anal. Biochem. 8, 527 (1964)

(70) SHILEY (J.D) ZIFF (M)
Physiol. Rev. 44, 30 (1964)

(71) SMITH (D.A) NORDIN (B.E.C)
Proc. Soc. Med. 57, 868 (1964).

(72) SMITH (D.A) RUKAVINA (J.G) HAALAND (E.M)
Acta derm. venerol. 45, 44 (1965)

(73) STEGEMANN (H)
Z. Physiol. Chem. 311, 41 (1958)

(74) TROLL (W) CANNAN (R.K)
J. Biol. Chem. 200, 803 (1953)

(75) WESTALL (R.G)
Biochem. J. 60, 247 (1955)

(76) WOESSNER (J.F)
Biochem. J. 83, 304 (1962)

(77) WOESSNER (J.F)
Arch. Biochem. Biophys. 93, 440 (1961)

(78) ZIFF (M) KIBRICK (A) DRESNER (E) GRIBETZ (H.J)
J. Clin. Invest. 35, 579 (1956).